



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO  
CLARO



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

**PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS A PARTIR DE AMIDOS  
DE DIFERENTES FONTES VEGETAIS E SEU EMPREGO NA  
INCLUSÃO MOLECULAR DE AROMA CÍTRICO**

**GISELE RODRIGUES CUCOLO**

Tese apresentada ao Instituto de Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

**Dezembro- 2009**

**GISELE RODRIGUES CUCOLO**

**PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS A PARTIR DE AMIDOS DE  
DIFERENTES FONTES VEGETAIS E SEU EMPREGO NA INCLUSÃO  
MOLECULAR DE AROMA CÍTRICO**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista Julio de  
Mesquita Filho, como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências Biológicas  
(Microbiologia Aplicada).

**Orientador: Prof. Dr. ROBERTO DA SILVA**

**Rio Claro**

**2009**

**GISELE RODRIGUES CUCOLO**

**PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS A PARTIR DE AMIDOS DE  
DIFERENTES FONTES VEGETAIS E SEU EMPREGO NA INCLUSÃO  
MOLECULAR DE AROMA CÍTRICO**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências do Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista Julio de  
Mesquita Filho, como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências Biológicas (Microbiologia  
Aplicada).

Comissão Examinadora

Prof. Dr. ROBERTO DA SILVA

Prof. Dr. RODRIGO SIMÕES R. LEITE

Prof. Dr. HAMILTON CABRAL

Prof<sup>a</sup>. Dra. MARIA DE LOURDES T. DE M. POLIZELI

Prof<sup>a</sup>. Dra. ELEONORA C. CARMONA

Rio Claro, 23 de dezembro de 2009.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus Pais, que dedicaram toda  
a vida aos filhos.

## **AGRADECIMENTOS**

### **Á Deus**

*por ter me amparado nesta caminhada.*

### **Aos anjos**

*um agradecimento especial a todos aqueles que nos últimos anos participaram diretamente ou indiretamente do meu amadurecimento profissional e pessoal.*

*Vocês contribuíram muito para o que sou hoje...*

*Ao **Prof. Dr. Roberto da Silva** pela confiança e por acreditar, apoiar e contribuir para a concretização deste sonho.*

### **Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo**

*pela preciosa ajuda e orientação dispensados ao longo deste trabalho.*

### **À minha amada família e amigos**

*pela compreensão, apoio, incentivo e amor, e por me suportarem durante este período tão complicado.*

*Muito obrigada*

## **RESUMO**

Ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é uma enzima capaz de formar ciclodextrinas (CDs), tendo o amido como substrato. A enzima é de grande interesse industrial, principalmente nas indústrias alimentícias, cosméticas, químicas e farmacêuticas. CDs são moléculas cíclicas formadas por monômeros de glicoses, unidos por ligações  $\alpha$ -1,4. Os tipos mais comuns de ciclodextrinas,  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - CD, consistem de 6, 7 e 8 monômeros de glicose, respectivamente. A molécula de CD possui uma estrutura única com a cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica, sendo possível a formação de complexos de inclusão com uma variedade de compostos, que pode melhorar ou proteger as propriedades físico-químicas da molécula encapsulada. Este estudo foi dividido em três capítulos, o primeiro foi uma revisão bibliográfica, e os outros dois são trabalhos de pesquisa. No primeiro trabalho estudou-se a produção de CDs pela CGTase do *Bacillus clausii* subgrupo E16, tanto em relação ao efeito da concentração do amido na produção das CDs, como em relação a utilização de fontes alternativas de amido (amido solúvel de batata PA, de milho, de trigo e de mandioca) como substrato. Observou-se que a enzima produziu preferencialmente  $\beta$ -CD nos diferentes tipos de substrato utilizados. O mais alto grau de conversão de CDs foi obtido com o uso de amido de mandioca, tendo convertido 95,30% (p/p) em  $\beta$ -CD, seguido de 86,60% (p/p) do amido solúvel. A concentração de 1% de amido de mandioca apresentou o melhor rendimento na produção de CDs. No segundo trabalho de pesquisa, o objetivo foi a produção de CDs pela CGTase do *Bacillus clausii* E16 em fontes alternativas de substrato (farelo de trigo, farelo de mandioca; farinhas de milho, trigo e mandioca). Observou-se que a enzima produziu  $\beta$ -CD nos diferentes tipos de substratos utilizados. O grau de conversão de CDs obtido, utilizando-se farelo de mandioca, foi 40,48% (p/p) em  $\beta$ -CD. Estudos preliminares de encapsulação molecular, apontaram a complexação do flavor de limão pelas ciclodextrinas produzidas neste substrato.

**Palavras-chaves:** CGTase. Ciclodextrina. Farinha de mandioca. Farelo de mandioca. *Bacillus clausii*.

## ABSTRACT

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is an enzyme capable of converting starch into cyclodextrins (CDs) molecule. CDs are becoming increasingly popular in pharmaceutical, chemical, cosmetics and food industries. CDs are cyclic oligosaccharides compounded of glucose units jointed by  $\alpha$ -1,4 linkages. The most common types of cyclodextrins,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ - CD, consist of 6, 7 and 8 glucose units, respectively. A CD molecule has a unique torus-shaped structure with a hydrophobic internal cavity and a hydrophilic external surface. As a result, CDs can form inclusion complexes with many hydrophobic guest molecules and thereby change their physical and chemical properties. This study was divided in three chapters, the first is about one bibliographic review, and the other are about two research approaches. The aim of the first work was to verify the effect of different starch botanical sources and the concentration of starch in the production of cyclodextrins by CGTase enzyme from *Bacillus clausii* E16. It was noticed that the enzyme mainly produced  $\beta$ -CD with the different types of starch (soluble potato starch, corn starch, wheat starch and cassava starch) used substrate. The higher degree of conversion of CDs was obtained with the use cassava starch, of which 95,30% (w/w) was converted in  $\beta$ -CD, followed by 86,60% (w/w) of soluble starch. The concentration 1% of cassava starch showed the best efficiency in the production of CDs. In the second research work, the aim was studied the application of a CGTase from *Bacillus clausii* E16 in alternative substrate sources (cassava bran, wheat bran; corn meal, wheat flour e cassava flour) for production of cyclodextrins. It was noticed that the enzyme produced  $\beta$ -CD with the different types of used substrate. The degree of conversion of CDs obtained with the use cassava bran was 40,48% (w/w) in  $\beta$ -CD and preliminary studies of molecular encapsulation pointed to a complexation of the lemon flavor with the cyclodextrins produce in this substrate.

**Key words:** CGTase. Cyclodextrin. Cassava flour. Cassava bran. *Bacillus clausii*.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AMG - Amiloglucosidase

CDs - Ciclodextrinas

CGTase - Ciclodextrina-glicosil-transferase

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DNS - Àcido dinitro-salicílico

LBMA - Laboratório de bioquímica e microbiologia aplicada

P/p - Peso/peso (usado somente entre parênteses)

Rpm - Rotações por minuto

TIM - Isomerase triose-fosfato

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO I</b> .....	10
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
INTRODUÇÃO.....	11
Enzimas envolvidas na degradação do amido .....	13
FAMILIA $\alpha$ -AMILASE DAS GLICOSIL HIDROLASES (FAMILIA 13).....	16
Características Gerais.....	18
Estrutura tridimensional da família $\alpha$ -amilase.....	19
Regiões conservadas .....	21
CICLODEXTRINA - GLICOSIL-TRANSFERASE (CGTase) .....	23
Histórico.....	23
Mecanismos de ação da ciclodextrina-glicosil-transferase .....	25
Papel da CGTase e metabolismo das CDS pelos microrganismos .....	27
Produção da ciclodextrina-glicosil-transferase .....	29
Purificação da ciclodextrina-glicosil-transferase.....	30
Aplicações da ciclodextrina-glicosil-transferase .....	36
CICLODEXTRINAS (CDs) .....	40
Características e propriedades das CDs.....	44
Inclusão molecular .....	50
Ciclodextrinas em alimentos .....	52
REFERÊNCIAS .....	55
<b>CAPÍTULO II</b> .....	73
<b>EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE AMIDO NA PRODUÇÃO DE <math>\beta</math>- CICLODEXTRINAS PELA CGTase DO <i>BACILLUS CLAUSII</i> E16</b> .....	73
RESUMO.....	74
SUMMARY .....	74
INTRODUÇÃO.....	75
MATERIAL E MÉTODOS .....	77
Reagentes .....	77
Microrganismo e condições de produção da CGTase.....	77
Purificação da CGTase.....	77
Análises da atividade CGTase.....	78
Determinação do açúcar redutor e de proteína .....	78
Efeito do tipo de amido e da concentração de substrato na produção de CDs.....	79
Quantificação de CDs produzidas.....	79
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	79

Efeito da concentração dos substratos na produção de CDs em diversas fontes de amidos.....	79
CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS .....	90
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>94</b>
<b>USO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS E OUTRAS FONTES DE AMIDO COMO SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS.....</b>	<b>94</b>
RESUMO.....	95
SUMMARY .....	95
INTRODUÇÃO.....	96
MATERIAIS E MÉTODOS .....	98
Reagentes .....	98
Microrganismo e condições de produção da CGTase.....	99
Purificação da CGTase .....	99
Análises da atividade CGTase .....	100
Determinação do açúcar redutor e de proteína .....	100
Produção de CDs em resíduos agro-industriais e outras fontes de amido .....	100
Quantificação de CDs .....	101
Produção de CDs em farelo de mandioca em diferentes tratamentos .....	101
Produção de CDs e secagem em spray dryer.....	102
Encapsulação de aroma de limão em CDs produzidas em farelo de mandioca .....	102
Análise da retenção do aroma pelas CDs .....	103
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	104
Produção de CDs em resíduos agro-industriais e outras fontes de amido.....	104
Produção de CDs em farelo de mandioca em diferentes tratamentos enzimáticos .....	108
Produção de CDs e secagem em spray dryer.....	111
Encapsulação de aroma de limão em CDs produzidas em farelo de mandioca .....	113
CONCLUSÕES.....	114
REFERÊNCIAS .....	115

## **CAPÍTULO I**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

## INTRODUÇÃO

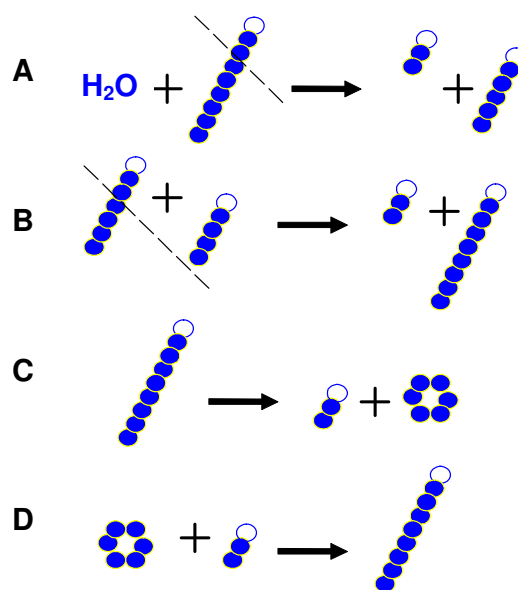
O amido é o substrato da ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase; EC 2.4.1.19) para a formação de ciclodextrinas (CDs). Ele é um polímero de glicose de alta massa molecular, encontrado em muitas plantas superiores como a principal fonte de reserva nutricional, além de fornecer de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. Esse polímero é mais amplamente encontrado em sementes (ex. trigo, milho), tubérculos (ex. batata) e raízes (ex. mandioca), onde estão organizados na forma de grânulos. O grânulo de amido é constituído de dois tipos de polímeros de glicose: a amilose e a amilopectina (MALDONADO & LÓPEZ, 1995; SHUKLA, 1991; ROBYT, 1998; BULÉON et al, 1998; THOMAS & ATWELL, 1999; VAN DER VEEN et al, 2000a; VAN DER MAAREL et al, 2002; JOBLING, 2004; TESTER et al, 2004). A amilose é uma molécula essencialmente linear, constituída de unidades de glicose ( $\alpha$ -D-glicopiranosil) unidas entre si por ligações  $\alpha$ -1,4. A amilopectina é formada por centenas de cadeias curtas de  $\alpha$ -1,4-glucanas, que são interligadas por aproximadamente 5% de ligações  $\alpha$ -1,6, formando uma estrutura altamente ramificada (JOBBLING, 2004).

O amido é um dos polissacarídeos de grande importância para a indústria alimentícia, devido as suas características funcionais e qualidade nutricional. Assim, têm uma grande aplicação seja diretamente como alimento ou como texturizante,

estabilizante, ligante, gelatinizante, dentre outras aplicações nas formulações alimentares (JOBLING, 2004). A degradação total do amido se dá principalmente, pela ação combinada de enzimas amilolíticas, as quais atuam na hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, especificamente.

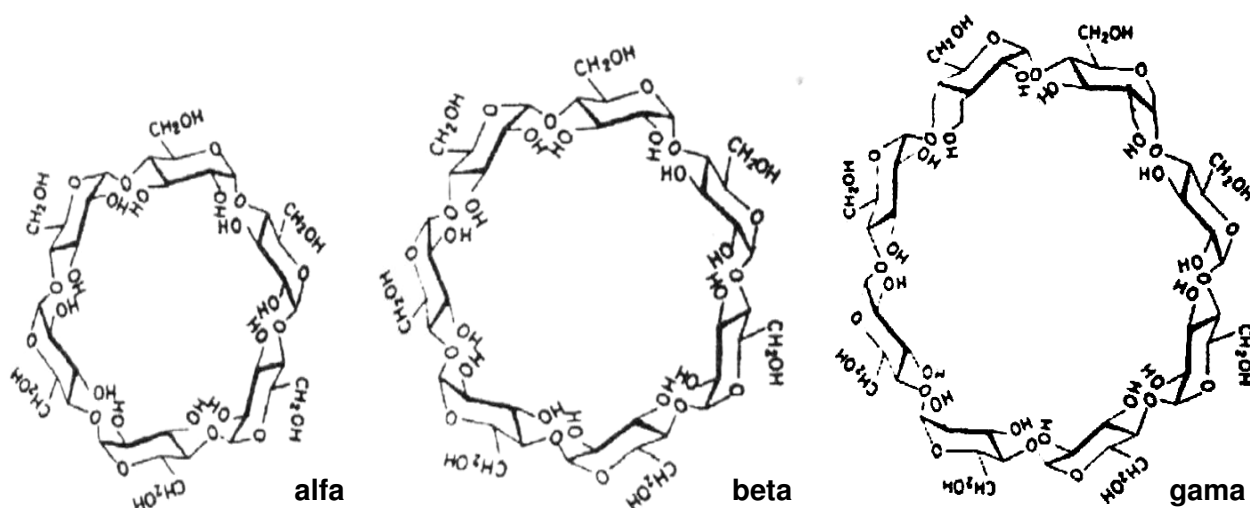
A utilização de enzimas amilolíticas tem aumentado abundantemente, e dentre essas enzimas, a CGTase vem ganhando grande importância industrial. A CGTase tem a capacidade de modificar o amido, catalisando a **hidrólise** das ligações glicosídicas e a subsequente reação de transglicosilação intramolecular ou **ciclização** dos oligossacarídeos (figura1), formando as ciclodextrinas que são moléculas cíclicas, compostas de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (VAN DER VEEN et al., 2000a).

A CGTase também catalisa outros dois tipos de reações (figura 1), descritas a seguir. A reação de **acoplamento** é reversa a ciclização, onde o anel de CD é clivado e transferido para um substrato receptor linear. A reação de **desproporcionamento** é uma reação de transferase propriamente dita, onde um maltooligossacarídeo é clivado e transferido para um substrato receptor linear (ABELYAN et al., 2004; ALVES-PRADO et al, 2002a; BENDER, 1985; BOVETTO et al., 1992; TONKOVA, 1998; UITDEHAAG et al., 1999; VAN DER VEEN et al., 2000a; WIND et al., 1995).



**Figura 1:** Reações de catálise da CGTase. Círculos representam moléculas de glicose; Esferas brancas indicam a extremidade redutora. (A) hidrólises; (B) desproporcionamento; (C) ciclização; (D) acoplamento. **Fonte modificada:** VAN DER VEEN et al., 2000a.

As ciclodextrinas (CDs) são maltooligosacarídeos cíclicos não-redutores com 6 a 13 unidades de glicose (BENDER, 1986; LARSEN et al., 1998a) ligadas entre si, por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. As CDs mais comuns são do tipo  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -, constituídas de seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (figura 2). Suas cavidades internas são hidrofóbicas, mas externamente são hidrofílicas. Formam complexos de inclusão com uma variedade de substâncias, mudando as suas características físicas e químicas. Essa propriedade da CD tem levado a um aumento na sua aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, produtos agroquímicos, plásticos e outras (ALLEGRE & DERATANI, 1994; ALVES-PRADO et al, 2002a; BENDER, 1986; PSZCZOLA, 1988; SHUKLA, 1991; SZEJTLI, 1982, 1985, 1997, 2003; SÁ BARRETO & CUNHA FILHO, 2008).

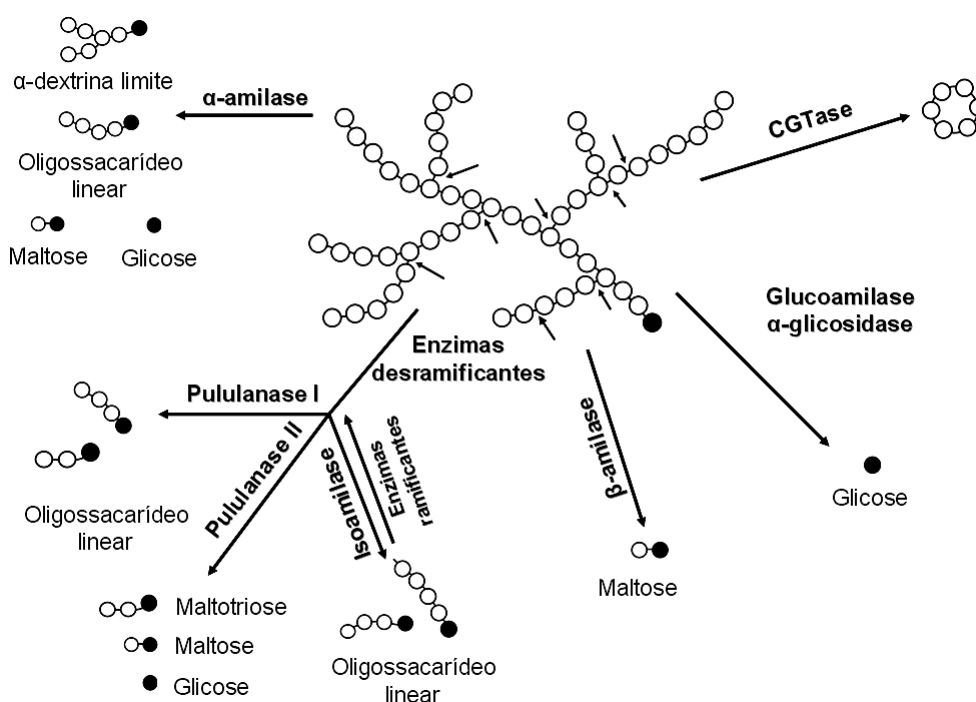


**Figura 2.** Estruturas da  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD. **Fonte:** VAN DER VEEN et al., 2000a.

### Enzimas envolvidas na degradação do amido

O amido pode ser degradado utilizando-se hidrólise ácida, ácida-enzimática, ou apenas enzimática, mas a utilização de enzimas amilolíticas, em substituição às substâncias químicas, na produção de derivados de amido tem apresentado algumas vantagens. Primeiro, quanto à especificidade das enzimas na produção de

xaropes de açúcar com propriedades químicas e físicas conhecidas e segundo que a hidrólise enzimática resulta em poucas reações intermediárias e menor escurecimento. Várias enzimas capazes de degradar o amido são hidrolíticas, elas quebram as ligações na molécula do amido, reagindo em presença de água, resultando em uma nova extremidade não redutora. Tais enzimas podem ser classificadas grosseiramente em amilases, que hidrolisam as ligações do tipo  $\alpha$ -1,4, e amilases desramificantes que hidrolisam as ligações do tipo  $\alpha$ -1,6. Basicamente, existem quatro grupos de enzimas que convertem o amido os quais estão representados na figura 3: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificantes e as transferases (VIHINEN & MÄNTSÄLÄ, 1989; STARNES, 1990; ZAMOST et al, 1991; HOLLÓ & HOSCHKE, 1993; MALDONADO & LÓPEZ, 1995; NIGAM & SINGH, 1995; BULÉON et al, 1998; THOMAS & ATWELL, 1999; VAN DER VEEN et al 2000a; VAN DER MAAREL et al, 2002).



**Figura 3.** Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) molécula de glicose com extremidade redutora; (○) molécula de glicose sem extremidade redutora; (→) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido. **Fonte:** VAN DER VEEN et al, 2000a, HORVÁTHOVÁ et al, 2000 e BERTOLDO e ANTRANIKIAN, 2002.

Exemplos de enzimas desramificantes são isoamilases (EC 3.2.1.68) e pululanases tipo I (EC 3.2.1.41). A maior diferença entre estas enzimas é o fato das pululanases possuírem a habilidade de degradar pululano, um oligossacarídeo constituído de repetições de maltotriose unidos por ligações  $\alpha$ -1,6. Pululanases hidrolisam ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 tanto em pululano e amilopectina, enquanto isoamilases podem somente hidrolisar as ligações  $\alpha$ -1,6 na amilopectina. Ambas as enzimas só catalisam a degradação de moléculas de amilopectina no amido, e os produtos da degradação destas enzimas são oligossacarídeos lineares longos (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Existem ainda, diversos tipos de pululanases que podem hidrolisar tanto ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 quanto  $\alpha$ -1,6. Elas pertencem às pululanases do grupo II, e são conhecidas como  $\alpha$ -amilases-pululanases ou amilopululanases. Seus produtos da degradação são maltose e maltotriose. (VAN DER MAAREL et al., 2002)

As amilases podem ser subdivididas em enzimas de ação endo e exo. Uma típica endo-enzima é a  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1), que cliva ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 aleatoriamente no interior das moléculas de amilose e amilopectina, produzindo oligossacarídeos ramificados de vários tamanhos. Amilases de ação exo, como as  $\beta$ -amilases (EC 3.2.1.2), quebram as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 a partir da parte final não-redutora do amido e tem como produtos da hidrólise somente oligossacarídeos de baixa massa molar (geralmente glicose ou maltose), (VAN DER VEEN et al., 2000a).

Como as enzimas citadas são incapazes de clivar os pontos de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 das moléculas de amilopectina, ocorre assim, uma degradação parcial do amido com formação de compostos de alta massa molar. Outras enzimas são necessárias para degradar esses compostos, as endo-enzimas amiloglucosidase (AMG) ou glucoamilase (EC 3.2.1.3) e a  $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20) são capazes de degradar esses macro-compostos pois atuam tanto em ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 quanto em  $\alpha$ -1,4, sendo que a quebra das ligações  $\alpha$ -1,4 ocorre em velocidade bem menor quando comparada com as de  $\alpha$ -1,6. Como produto da ação desta enzimas no amido, obtém-se moléculas de glicose. Glucoamilase e  $\alpha$ -glucosidase diferem ainda em relação aos seus substratos de maior afinidade:  $\alpha$ -glucosidase atua melhor em maltooligossacarídeos curtos, enquanto glucoamilase age preferencialmente em polissacarídeos de cadeias longas. (VAN DER VEEN et al., 2000a; VAN DER MAAREL et al., 2002).

Entre as enzimas de ação exo que atuam no amido, a ciclodextrina-glicosil-transferase, pertencente ao grupo das transferases, tem grande importância industrial. As transferases são enzimas que quebram ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador a um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica. As enzimas amilomaltase (EC 2.4.1.25) e ciclodextrina- glicosil-transferase (CGTase, EC 2.4.1.19) formam uma nova ligação  $\alpha$ -1,4, enquanto as enzimas de ramificação (EC 2.4.1.18) formam uma nova ligação  $\alpha$ -1,6. Essas enzimas realizam reações de transglicosilação intermolecular ou intramolecular, dependendo da posição do fragmento a ser transferido se está entre duas moléculas de açúcar (amilomaltase) ou se faz parte da mesma cadeia polissacarídica (CGTase e algumas enzimas ramificantes), respectivamente (MARTINS & HATTI-KAUL, 2003).

Os principais produtos da CGTase quando atua no amido são as ciclodextrinas (CDs) e dextrinas ramificadas de alto peso molecular (CGTase dextrina limite). Assim, essa enzima catalisa a conversão do amido, formando CDs, por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização). Exibe, ainda, atividade em reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento) e, em menor intensidade, em reações de hidrólise de amido (VAN DER VEEN et al., 2001; VAN DER MAAREL et al., 2002; MARTINS & HATTI-KAUL, 2003).

A tabela 1 apresenta alguns microrganismos produtores de enzimas que atuam no amido, com algumas características dessas enzimas.

### **FAMÍLIA $\alpha$ -AMILASE DAS GLICOSIL HIDROLASES (FAMÍLIA 13)**

A CGTase é um membro da família  $\alpha$ -amilase das glicosil-hidrolases (família 13), um importante grupo de enzimas capazes de realizar modificações nas moléculas de amido. Enzimas pertencentes a esse grupo atuam na molécula de amido, mas nem todas as amilases estão classificadas dentro dessa família, um exemplo é a  $\beta$ -amilase que pertence à família 14, e a glucoamilase que compreende a família 15. Pelo fato de as CGTases pertencerem à família 13 ( $\alpha$ -amilase), a seguir serão apresentadas algumas características referentes a essa família.

**Tabela 1.** Origem microbiana e características de algumas enzimas que atuam no amido.

<b>Enzimas</b>	<b>Organismo</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Temperatura ótima (°C)</b>
<b>α-amilase</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	49	70
	<i>Bacillus licheniformis</i>	62	90
	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>		55
	<i>Myceliophthora thermofila</i>		100
	<i>Pyrococcus furiosus</i>		100
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>		85
<b>β-amilase</b>	<i>Bacillus cereus var. mycoids</i>	35	50
	<i>Bacillus circulans</i>	53-63	60
	<i>Bacillus polymyxa</i>	44	45
	<i>Pseudomonas</i> sp BQ 6	37	45 – 55
	<i>Clostridium thermosulphurogenes</i>		75
<b>Glucoamilase</b>	<i>Aspergillus awamori</i>	83,7 - 88	60
	<i>Aspergillus oryzae</i>	76	60
	<i>Mucor rouxaianus</i>	59	55
	<i>Penicillium oxalicum</i>	86	60
	<i>Rhizopus delemar</i>	100	40
<b>α-glicosidase</b>	<i>Aspergillus awamori</i>	125 - 140	55
	<i>Aspergillus flavus</i>	63	35
	<i>Mucor javanicus</i>	124,6	55
	<i>Penicillium purpurogenum</i>	120	50
	<i>Saccharomyces logos</i>	270	40
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27	38
	<i>Bacillus brevis</i>	52	48 - 50
<b>Pululanase</b>	<i>Bacillus cereus var. mycoids</i>	112	50
	<i>Bacillus</i> sp n°202-1	92	55
	<i>Aerobacter aerogenes</i>	1.143	50
	<i>Pyrococcus furiosus</i>		98
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>		95
	<i>Thermus caldophilus</i> GK24		75
<b>Isoamilase</b>	<i>Cytophaga</i> sp	120	40
	<i>Pseudomonas amyloderamosa</i>	90	
<b>CGTase</b>	<i>Bacillus</i> sp alcalofílico	85 - 88	50
	<i>Bacillus macerans</i>	145	60
	<i>Bacillus lentus</i>	33	45 - 50
	<i>B. circulans</i> E192	78	60
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	66,8	80
	<i>Thermoanaerobacter thermosulfurigenes</i>	68	80 - 85

**Fonte:** ALVES-PRADO et al, 2002b; HAKI e RAKSHIT, 2003; ZHEKOVA et al., 2009.

### **Características gerais**

As enzimas glicosil hidrolases são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas entre dois carboidratos ou entre um carboidrato e um não carboidrato (LY & WITHERS, 1999). De acordo com a similaridade das seqüências de aminoácidos, as enzimas foram classificadas em 90 famílias, cujos membros de cada família apresentam em comum a estrutura tridimensional 3D e o mecanismo estereoquímico (HENRISSAT, 1991).

A família 13 das glicosil hidrolases (conhecida como família  $\alpha$ -amilase) é uma grande família que inclui a maioria das enzimas que degradam o amido como:  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase, pululanase, amilases produtoras de maltooligosacarídeos (maltotetraose, maltohexaose), glucodextranase, isoamilase e CGTase, exibindo uma variedade extraordinária de especificidade a substratos e produtos. Elas sempre compreendem três reações específicas, sendo hidrolase, transglicosidade e isomerase, envolvendo as ligações  $\alpha$ -1,4 e/ou  $\alpha$ -1,6 (McGREGOR et al, 2001; JANECEK, 2000). As  $\alpha$ -amilases são as enzimas mais estudadas nessa família. São encontrados vários artigos de revisão envolvendo a estrutura molecular, o mecanismo catalítico, a especificidade, as propriedades e a estabilidade da família  $\alpha$ -amilase (VAN DER MAAREL et al, 2002; McGREGOR et al, 2001; SVENSSON, 1994; JANECEK, 1997). Sendo que Janecek e colaboradores têm se dedicado ao estudo evolutivo dessas enzimas (JANECEK, 1995, 1997, 2000; JANECEK et al, 1997, 2003).

Para ser um membro da família  $\alpha$ -amilase, a enzima deve atender os seguintes critérios (KURIKI & IMANAKA, 1999; VAN DER MAAREL et al, 2002): i) atuar em ligações  $\alpha$ -glicosídicas produzindo mono ou oligossacarídeos  $\alpha$ -anoméricos (hidrólise) e/ou formando novas ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6 (transglicosilação); ii) apresentar uma estrutura  $(\beta/\alpha)_8$ -barril; iii) apresentar a seqüência primária com quatro regiões altamente conservadas, contendo todos os aminoácidos essenciais para a catálise; iv) apresentar três grupos de ácidos carboxílicos, sendo um resíduo de ácido glutâmico (Glu) e dois resíduos de ácido aspártico (Asp), os quais são essenciais para a catálise.

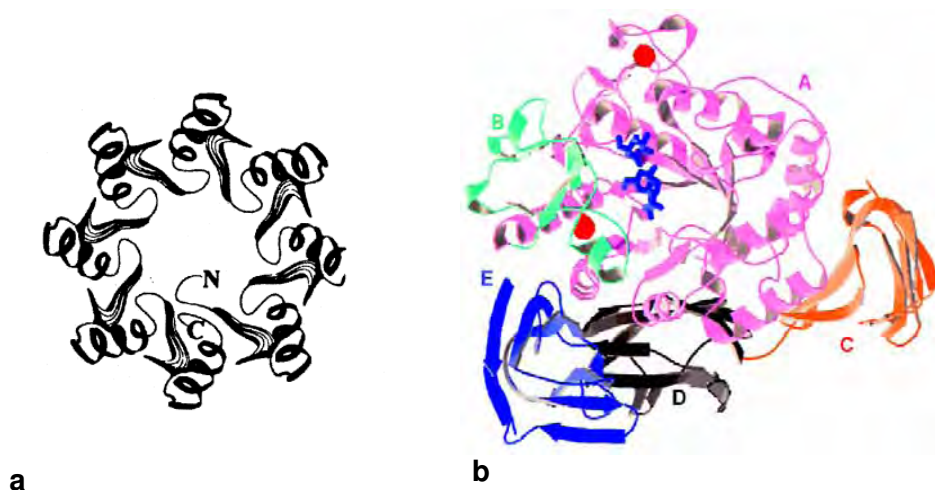
### Estrutura tridimensional da família $\alpha$ -amilase

Os membros da família  $\alpha$ -amilase são proteínas com multidomínios e o tipo de organização desses domínios é que determinam a especificidade e ação da enzima. Por exemplo, a  $\alpha$ -amilase apresenta três domínios A, B e C, enquanto a CGTase apresenta cinco domínios A, B, C, D e E (VAN DER MAAREL et al, 2002; JESPERSEN et al, 1991). O domínio A, geralmente está localizado na região N-terminal, compreende o domínio catalítico dessas enzimas. Ele é o domínio mais conservado dessa família e apresentam cerca de 300-400 aminoácidos contidos em uma dobra altamente simétrica de oito fitas  $\beta$  paralelas, organizadas em forma tubular e cercadas por oito  $\alpha$ -hélices, dobradas dentro de uma estrutura característica de  $(\beta/\alpha)_8$ -barril (figura 4a). Essa estrutura foi inicialmente identificada em 1975 em uma isomerase triose-fosfato (TIM) de músculo de galinha, então ela foi comumente referida como estrutura TIM-barril. Entretanto, tal estrutura tem sido amplamente encontrada em diferentes enzimas. A estrutura de  $(\beta/\alpha)_8$ -barril apresenta diversas prolinas e glicinas, altamente conservadas, flanqueando a conexão das fitas  $\beta$  com as  $\alpha$ -hélices, as quais formam a região catalítica (JANECEK, 2000; HORVÁTHOVÁ et al, 2000; MCGREGOR et al, 2001).

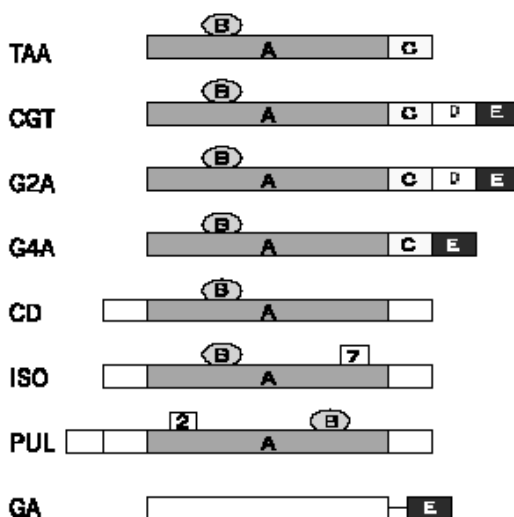
Os aminoácidos conservados de ligação catalítica e de ligação ao substrato na família  $\alpha$ -amilase estão localizados no “loop” da extremidade C das fitas  $\beta$ , no domínio A. Um longo “loop” que emerge entre a fita  $\beta_3$  e a  $\alpha$ -hélice 3 do domínio catalítico é considerado um domínio estrutural a parte, o domínio B. O domínio B é constituído de 44-133 aminoácidos, sendo que seu tamanho e sua estrutura variam de acordo com os membros da família e acredita-se ainda, que ele seja o responsável pelas diferenças na especificidade quanto ao substrato (SVENSSON, 1994; RODENBURGO et al, 1994). Nele se encontram também, os aminoácidos envolvidos na estrutura de ligação do cálcio, importante para a manutenção da estabilidade da estrutura requerida para a catálise (BOEL et al, 1990; JANECEK et al, 1997).

O domínio C tem a extensão de aproximadamente 100 aminoácidos e tem uma fita  $\beta$  interna e antiparalela. Os domínios complementares ao domínio A e B, que podem variar de C ao I, comuns às enzimas da família  $\alpha$ -amilase, podem estar posicionados posterior ou anteriormente ao domínio A. A figura 4b ilustra a estrutura tridimensional da CGTase produzida por *Bacillus circulans* 251, visualizando a

disposição dos cinco domínios. Na figura 5 pode ser observada a disposição dos domínios de algumas enzimas envolvidas na degradação do amido (JESPERSEN et al, 1991).



**Figura 4.** Representação esquemática das estruturas da CGTase de *Bacillus circulans*: a) estrutura barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>- e b) 3D da CGTase. **Fonte:** NILSEN & BORCHET, 2000.



**Figura 5.** Nível de organização dos domínios de enzimas que degradam o amido. TAA:  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae* (Taka amilase A); CGT: CGTase de *Bacillus circulans*; G2A:  $\alpha$ -amilase maltogênica de *Bacillus stearothermophilus*; G4A:  $\alpha$ -amilase formadora de maltotetraose de *Pseudomonas stutzeri*; CD: ciclodextrinase de *Klebsiela oxytoca*; ISO: isoamilase de *Pseudomonas amyloclavata*; PUL: pululanase de *Klebsiela aerogenes*; GA: glucoamilase de *Aspergillus niger* (família 15 das glicosil hidrolases). **Fonte:** VAN DER VEEN et al. 2000a e 2000c.

### Regiões conservadas

A similaridade entre os membros da família  $\alpha$ -amilase é menor que 30%, entretanto, foram identificadas sete regiões de seqüências conservadas (I a VII) (JANECEK, 2000). Essas regiões estão posicionadas nas fitas  $\beta$  do domínio A, sendo que as quatro regiões mais conservadas, região I, II, III e IV estão nas fitas  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5 e  $\beta$ 7, outra região conservada, região V está no “loop” 3 do domínio B e as duas regiões menos conservadas, região VI e VII estão nas fitas  $\beta$ 2 e  $\beta$ 8 do domínio A. Elas contêm os aminoácidos conservados envolvidos não apenas na catálise e ligação ao substrato (regiões I-IV), mas também na ligação do cálcio e na especificidade da enzima (V-VII) (JANECEK, 2002).

Essas regiões são encontradas em outros membros da família das  $\alpha$ -amilases,  $\alpha$ -glucosidases, pululanases, isoamilases e CGTases. Uma seqüência de aminoácidos alinhados mostrando as cinco regiões semelhantes para os diversos membros da família das  $\alpha$ -amilases é mostrada na figura 6. Todas as quatro regiões contêm resíduos de aminoácidos invariantes na família das  $\alpha$ -amilases e as funções da maioria delas foram esclarecidas por cristalografia, mutação sítio dirigida e modificação química de vários membros dessa família. Esses resíduos estão diretamente envolvidos em catálises, encadeamento de compostos, quebra de ligações, estabilização de estado de transição, ou como ligante de um encadeamento de cálcio próximo da região ativa. Três grupos de ácidos carboxílicos, um ácido glutâmico e dois ácido aspártico, são encontrados e considerados essenciais para a atividade de catálise nas  $\alpha$ -amilases e nas CGTases. Os aminoácidos são equivalentes a Asp206, Glu230 e Asp297 na  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae* e Asp229, Glu257 e Asp328 na CGTase de *Bacillus circulans*. Dois resíduos conservados de histidina, His140 e His327 (numeração da CGTase) estão envolvidos na ligação do substrato e estabilização de estado de transição. Uma terceira histidina, presente apenas em algumas  $\alpha$ -amilases e CGTases (His233, numeração da CGTase), é responsável pela ligação do substrato e atua como um ligante de cálcio com o seu correspondente oxigênio carbonílico. Arg227 é importante para a orientação de um íon (Asp229). O papel de Asp135 não é claro, mas é bastante próximo da região catalítica. Asn139 também é um ligante de cálcio. A importância da região de encadeamento de cálcio é ilustrada pela identificação da quinta região remanescente nas  $\alpha$ -amilases e, mais recentemente, em diversos

outros membros da família das  $\alpha$ -amilases. Essa região consiste da área 197-LADLN na CGTase de *B. circulans*, linhagem 251 (173-LPDLD na  $\alpha$ -amilase de *A. oryzae*) e contém o ligante de cálcio Asp199 (VAN DER VEEN et al, 2000a; VAN DER MAAREL et al, 2002; JANECEK, 2002).

	Região I – $\beta_3$	Região V – <i>loop3</i>	Região II – $\beta_4$	Região III – $\beta_5$	Região IV – $\beta_7$
<b><math>\alpha</math>-amilase</b>	117_DV <b>V</b> AN <b>H</b>	173_L <b>P</b> D <b>L</b> D	202_G <b>L</b> R <b>I</b> D <b>T</b> V <b>K</b> H	226_Y <b>C</b> I <b>G</b> E <b>V</b> L <b>D</b>	292_F <b>V</b> E <b>N</b> H <b>D</b>
<b>CGTase</b>	135_D <b>F</b> A <b>P</b> N <b>H</b>	197_L <b>A</b> D <b>F</b> N	225_G <b>I</b> R <b>V</b> D <b>A</b> V <b>K</b> H	253_F <b>T</b> F <b>G</b> E <b>W</b> F <b>L</b>	323_F <b>I</b> D <b>N</b> H <b>D</b>
<b>Isoamilase</b>	135_D <b>V</b> V <b>Y</b> N <b>H</b>	342_G <b>A</b> N <b>F</b> N	371_G <b>F</b> R <b>F</b> D <b>L</b> A <b>S</b> V	431_D <b>L</b> F <b>A</b> E <b>P</b> W <b>A</b>	505_F <b>I</b> D <b>V</b> H <b>D</b>
<b>Cdase</b>	238_D <b>A</b> V <b>F</b> N <b>H</b>	292_M <b>P</b> K <b>L</b> N	321_G <b>W</b> R <b>L</b> D <b>V</b> A <b>N</b> E	350_Y <b>I</b> L <b>G</b> E <b>V</b> W <b>H</b>	416_L <b>L</b> D <b>S</b> H <b>D</b>
<b>Neopululanase</b>	242_D <b>A</b> V <b>F</b> N <b>H</b>	295_M <b>P</b> K <b>L</b> R	324_G <b>W</b> R <b>L</b> D <b>V</b> A <b>N</b> E	353_Y <b>I</b> L <b>G</b> E <b>I</b> W <b>H</b>	419_L <b>L</b> G <b>S</b> H <b>D</b>

**Figura 6.** Alinhamento da seqüência de aminoácidos das regiões conservadas I, II, III e IV para diferentes membros da família  $\alpha$ -amilase. Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) de *Bacillus circulans* n<sup>o</sup>8 (NITSCHKE et al, 1990);  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae* (MATSUURA et al, 1984); Ciclomaltodextrinase (CDase) de *Klebsiela oxytoca* (FIEDLER et al, 1996); Isoamilase de *Pseudomonas amyloclavata* (AMEMURA et al, 1988); Neopululanase de *Klebsiela aerogenes* (KATSURAGI et al, 1987). Código de cores: verde: aspartato e glutamato catalíticos; amarelo: histidina funcional; rosa: aspartato de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$ ; vermelho: resíduos não conservados; azul: arginina invariante; cinza: resíduos conservados. **Fonte:** JANECEK, 2002

Assim, as regiões I-IV comportam os resíduos de aminoácidos conservados, no ou próximo ao sítio ativo, que tem um papel direto na clivagem da ligação glicosídica, ligação ao substrato, estabilização do estado de transição e na ligação do cálcio. As regiões II e III são importantes também, por conter os resíduos característicos para especificidade ao tipo de ligação ( $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6) (McGREGOR et al, 2001). A região V, no domínio B, contém o Asp199, um dos resíduos mais conservados envolvidos na ligação do cálcio na família  $\alpha$ -amilase. As regiões VI e VII estão relacionadas a especificidade da enzima, entretanto sua importância é pouco conhecida até o momento.

## CICLODEXTRINA-GLICOSIL-TRANSFERASE (CGTase)

### Histórico

O primeiro relato da existência das ciclodextrinas foi feito por Villiers, em 1891. Usando técnicas bacteriológicas rudimentares e, provavelmente, cultura impura apresentando contaminação com *Bacillus macerans*, Villiers obteve uma pequena quantidade de um material cristalino (cerca de 3g/Kg de amido) a partir da hidrólise de amido por *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*), o qual a composição desse material foi determinada pela fórmula  $(C_6H_{10}O_3).3H_2O$ . Villiers denominou esse produto de "celulosina", por visualizar semelhanças com a celulose e por ser resistente à ação de hidrólise ácida e não apresentar propriedades redutoras. Villiers relatou também ter observado dois cristais distintos de celulosina, que mais tarde foram descritos por Schardinger (FRENCH, 1957; SZEJTLI, 1998; ROBYT, 1998; ARMSPACH et al., 1999).

Schardinger, em 1903, observou que uma linhagem bacteriana denominada de II, isolada de alimento deteriorado, era resistente ao calor e tinha a capacidade de fermentar o amido com produção de duas dextrinas cristalinas. Uma delas, a A, era formada por cristais hexagonais; a outra, B, por cristais prismáticos. Estas dextrinas não apresentavam poder redutor (SÁ BARRETO & CUNHA FILHO, 2008). Em 1911, Schardinger trabalhando com linhagens resistentes à temperatura durante processos de cozimento de alimentos, isolou uma linhagem que produzia dextrinas semelhantes a celulosina de Villiers. A linhagem isolada foi denominada de *Bacillus macerans* e quando cultivado na presença de amido, produzia grandes quantidades das dextrinas cristalinas A e B (cerca de 25-30%), as quais ele denominou de  $\alpha$ - e  $\beta$ -dextrinas cristalinas (FRENCH, 1957). A partir dos estudos de Schardinger estas dextrinas passaram a ser conhecidas como dextrinas de Schardinger.

Segundo French (1957), os 24 anos seguintes não foram muito frutíferos no campo da pesquisa sobre a química das dextrinas cristalinas, destacando-se neste período, os pesquisadores Pringsheim e Karrer. A literatura é extensa, mas muito repetitiva com muitas controvérsias e baseada em conceitos errôneos. O período de 1935 a 1950 foi considerado por French (1957) como um período de maturação, destacando-se os trabalhos de Freudenberg e seu grupo. Em 1938, eles confirmaram a estrutura cíclica das dextrinas de Schardinger e a capacidade de formar a inclusão molecular. Tilden e Hudson (1942), estudando o *Aerobacillus macerans*,

descobriram que este microrganismo produzia uma enzima, a qual convertia amido gelatinizado em uma mistura de dextrinas sem poder redutor, contendo as  $\alpha$  e  $\beta$  dextrinas cristalinas de Schardinger.

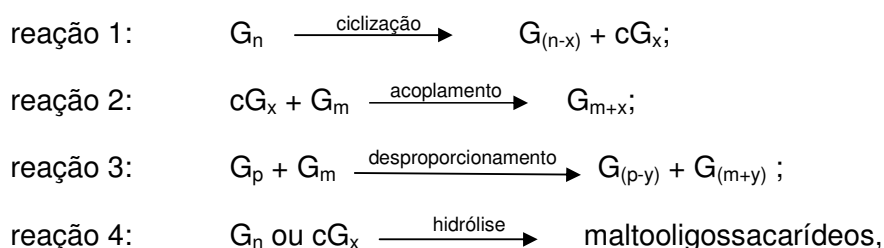
MCCLENAHAN et al (1942) observaram a conversão do amido de batata em dextrinas cristalinas de Schardinger pelo *Bacillus macerans*, o qual produzia um novo tipo de enzima, presente no filtrado livre das células microbianas. French e Rundle (1942), por difração de raio-X, determinaram a massa molecular e o número de unidades de glicose para  $\alpha$  e  $\beta$  ciclodextrinas.

Freudenberg e Cramer (1950; citado por FRENCH, 1957) determinaram a massa molecular e o número de unidades de glicose para a  $\gamma$ -CD. Norberg e French (1950) descreveram a ação reversível da enzima produzida pelo *Bacillus macerans*. A partir da década de 50 dois grupos de pesquisadores, French e Cramer, intensificaram suas pesquisas quanto à produção enzimática de ciclodextrina, o fracionamento do produto puro e a caracterização de suas propriedades químicas e físicas. Freudenberg, Cramer e Plieninger (1953) obtiveram a primeira patente abordando os aspectos mais importantes da aplicação de ciclodextrina nas formulações de medicamentos, envolvendo a complexação com ciclodextrinas.

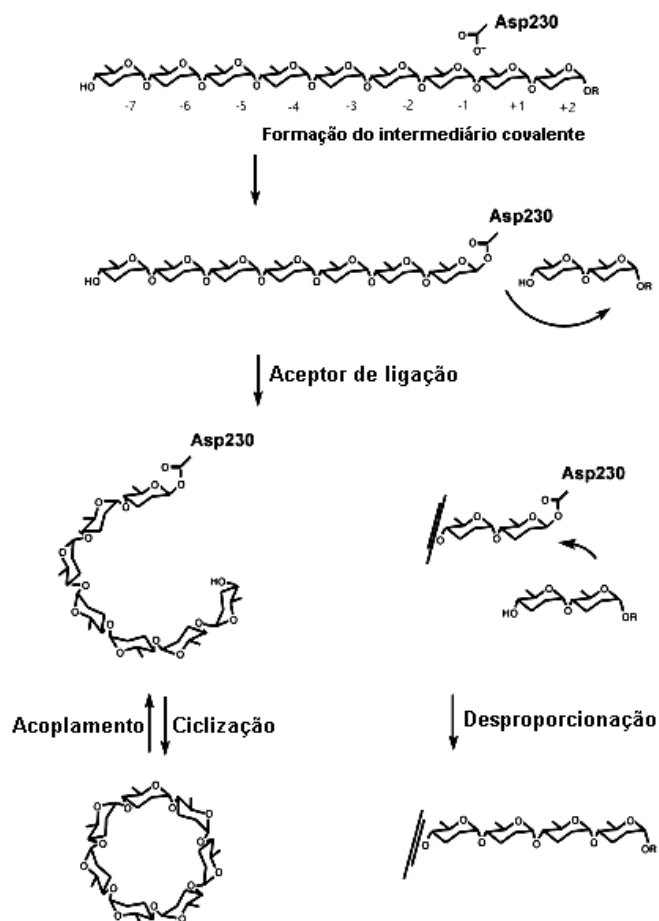
No final da década de 60, numerosas opções para a produção de CDs, por ação enzimática no amido, foram propostas na literatura e os processos de purificação foram aprimorando-se (PSZCZOLA, 1988). Em 1969, a Corn Products International Co. produziu  $\beta$ -CD usando a CGTase de *Bacillus macerans*. A Teijin Ltd., no Japão, também produziu  $\beta$ -CD, usando a mesma enzima em uma planta piloto, mas sérios problemas foram encontrados em ambos os processos. Os rendimentos da produção de CD, a partir do amido eram baixos, 20 a 30% em escala industrial. Deste modo, a CGTase de *Bacillus macerans* não foi adequada para aplicação industrial, por não ser suficientemente termoestável (HORIKOSHI, 1996). No mesmo ano, Horikoshi iniciou, num instituto do governo japonês, um estudo para produção de CD, utilizando a CGTase do *Bacillus* sp alcalofílico. Em 1977, uma empresa japonesa iniciou a produção de CD em escala industrial, sob a denominação de Celdex, utilizando o método proposto por Horikoshi com a CGTase do *Bacillus* sp alcalofílico (NSKC, 1983). A produção industrial de CD no Japão atingiu, então 600 toneladas/ano, sendo que a maior parte do produto era destinada à indústria de alimentos (PSZCZOLA, 1988).

### Mecanismos de ação da ciclodextrina- glicosil-transferase

A CGTase é uma enzima complexa que catalisa pelo menos três tipos de reações, descritas a seguir. A reação de transglicosilação intramolecular, também denominada, reação de ciclização para formar as CDs, (reação 1). A reação de acoplamento que é reversa a ciclização, onde o anel de CD é clivado e transferido para um substrato receptor linear (reação 2); e a reação de desproporcionamento que é uma reação de transferase propriamente dita, onde um maltooligossacarídeo é clivado e transferido para um substrato receptor linear (reação 3). A enzima apresenta ainda, uma fraca atividade hidrolítica em presença de amido, maltooligossacarídeos ou CDs (reação 4) (ABELYAN et al, 1994; BENDER, 1986; BOVETTO et al, 1992; TOMITA et al, 1993; TONKOVA, 1998; UITDEHAAG et al, 1999; VAN DE VEEN et al, 2000; WIND et al, 1995; ZHEKOVA et al., 2009). As reações citadas estão apresentadas a seguir:



onde o símbolo  $G_n$  é o amido; e  $G_m$  e  $G_p$  representam cadeias de maltooligossacarídeos contendo  $m$  e  $p$  unidades de  $\alpha$ -1,4-glicopiranoses, respectivamente;  $y$  representa unidades de  $\alpha$ -1,4-glicopiranoses transferidas;  $cG_x$  representa uma CD composta de  $x$  unidades de glicose. Na figura 7 têm-se uma representação esquemática das reações catalisadas pela enzima CGTase.



**Figura 7.** Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase. No primeiro passo da reação, um Asp é ligado covalentemente, no sítio de clivagem, formando um oligossacarídeo intermediário. Em um segundo passo, esse oligossacarídeo é transferido para uma molécula receptora. **Fonte:** LEEMHUIS et al, 2003.

O mecanismo catalítico para a CGTase é composto de um número de subsítios de ligação de açúcar, resultante da cadeia de aminoácidos localizada entre os *loops* das fitas  $\beta$  e  $\alpha$ -hélice do domínio catalítico. Cada um desses subsítios interage com uma unidade de glicose proveniente do substrato, por ligações de hidrogênio com grupos OH da glicose ou por interações hidrofóbicas. De acordo com sua localização os subsítios podem ser (i) doador (-1, -2,...) determinando o comprimento da cadeia de açúcar do intermediário covalente ou (ii) receptor (+1, +2,...) determinando qual será a molécula receptora. Assim, a clivagem da cadeia de açúcar ocorre entre os subsítios +1 e -1. O número e constituição dos subsítios são também responsáveis pelas diferenças na especificidade ao produto da enzima e tem sido usado como ferramenta para mudanças na especificidade ao produtor em

proteínas engenheiradas (VAN DER VEEN et al, 2000a; VAN DER VEEN et al, 2000b; MCGREGOR et al, 2001; UTIDEHAAG et al, 1999; MARTINS, 2003; LEEMHUIS et al, 2003)

### **Papel da CGTase e metabolismo das CDs pelos microrganismos**

Muitas bactérias produtoras de CGTase podem utilizar a CD como fonte de carbono, assim elas podem tanto produzir enzimas que formam as CDs, a CGTase, bem como produzir enzimas que degradam as CDs, as ciclomaltodextrinases (CDase). Estudos realizados em *Klebsiella oxytoca* (FIEDLER et al, 1996) demonstraram que esse microrganismo tem um sistema semelhante ao *regulon* Maltose presente em *E. coli*. Esses organismos são capazes de utilizar o amido como única fonte de substrato e energia, fazendo uso apenas de uma pululanase e uma CGTase extracelular associada à superfície celular, para degradar os polímeros de alta massa molecular (BENDER, 1986). O metabolismo das CDs, produzidas pela ação da CGTase no amido, tem sido estudado e apresentou alta homologia com o metabolismo de maltodextrinas em *E.coli* (FIEDLER et al 1996; PAJATSCH et al 1998). Os genes que codificam as proteínas envolvidas no transporte e degradação da ciclodextrina no interior celular estão localizados em uma região do genoma chamado operon *Cym*, constituído de pelo menos oito genes. Quatro genes *cym B*, *C*, *I*, *J* ainda não tem seu papel totalmente esclarecido, mas um desses genes codifica a CGTase extracelular (*cgt*). O *cym A* codifica uma ciclosporina a qual possibilita à ciclodextrina penetrar a membrana externa. O produto do gene *cym B* transporta a ciclodextrina através do periplasma. Os genes *cym F*, *G* e *D* são responsáveis por codificar o transportador de ciclodextrina, dependente de ATP, localizado no periplasma. Finalmente, o *cym H* é um gene codificador de uma ciclomaltodextrinase (CDase) citoplasmática, a qual converte ciclodextrinas em maltose ou maltotriose (figura 8). Esses oligossacarídeos são degradados à glicose e glicose-1-fosfato pela ação da maltodextrina fosforilase e amilomaltase. Essas duas enzimas são produtos dos genes da *regulon* Maltose, que é requerida para o metabolismo de ciclodextrina.



### **Produção de ciclodextrina-glicosil-transferase**

O primeiro microrganismo descrito na literatura como produtor de CGTase foi o *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*) com o qual Villers produziu as primeiras dextrinas de Schardinger (FRENCH, 1957). *Bacillus macerans* (*Aerobacillus macerans*) foi isolado em 1904 por Schardinger, sendo que, Tilden e Hudson em 1939 realizaram os primeiros estudos com CGTase produzida por esse microrganismo. Tilden e Hudson (1942) comprovaram que as CDs não eram produtos sintetizados durante o metabolismo microbiano, e sim, resultado da ação de uma enzima extracelular produzida pelo microrganismo, a qual hidrolisava o amido e compostos relacionados. Estudaram 11 linhagens de *Bacillus macerans*, e concluíram que todas elas produziam uma amilase capaz de converter amido em dextrina de Schardinger. A enzima permaneceu relativamente estável ao calor, sendo que a inativação ocorreu após 1 hora a 50°C. A maior atividade foi apresentada entre pH 5,0 e 6,0, a 40°C.

Após os estudos de Tilden e Hudson vários outros autores voltaram suas pesquisas a microrganismos produtores de CGTase. Atualmente, tem-se vários microrganismos catalogados como produtores de CGTase, com suas respectivas características enzimáticas. A maioria das espécies bacterianas produtoras de CGTase pertencem ao gênero *Bacillus*, sendo relatadas também *Klebsiella pneumoniae* (BENDER, 1977), *Klebsiella oxytoca* (LEE et al, 1992), *Micrococcus luteus*, *Micrococcus varians* (citado por ABELYAN et al, 1995); bactérias anaeróbias termofílicas, *Thermoanaerobacter* sp (STARNES, 1990) e *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes* (WIND et al, 1995) e um actinomiceto, *Thermoactinomyces* sp (ABELYAN et al, 1995). Entretanto, ainda não há qualquer produção de CGTase por fungos ou outros organismos superiores, relatada pela literatura disponível.

Os meios testados para a produção de CGTase, inicialmente, foram do tipo sólido. Kitahata et al (1974) propuseram um meio líquido, usando amido solúvel e caldo de maceração de milho, enquanto Nakamura e Horikoshi (1976b) propuseram dois tipos de meio de produção, um com amido solúvel e caldo de maceração de milho e outro denominado de meio II, composto de amido solúvel, extrato de levedura, peptona, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Esse último meio, foi o mais difundido entre os pesquisadores, sendo que a maioria dos autores utiliza esse meio de produção como base para fermentações com microrganismos produtores de CGTase, principalmente *Bacillus*.

A produção de CGTase por *Bacillus macerans* foi melhor com o uso de amido solúvel ou maltoheptaose, maltooligossacarídeos de cadeia mais curta ( $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$ ) não estimularam a produção de CGTase (PÓSCI et al, 1998). Aplicando metodologia de superfície de resposta, foram otimizados componentes do meio de produção para as CGTase produzidas por *Bacillus firmus* (GAWANDE et al, 1998). A Tabela 2, apresenta a composição de alguns meios, utilizados para a produção de CGTase.

### **Purificação de ciclodextrina-glicosil-transferase**

Para a purificação da enzima CGTase na forma extracelular, inicialmente ela deve ser isolada do meio de cultivo. Após a remoção das células por centrifugação, a enzima pode ser extraída e concentrada a partir do sobrenadante. Em escala laboratorial, pode ser realizada a precipitação com solventes orgânicos, tais como etanol e acetona, com sais como sulfato de amônio, ou ainda concentrar por ultrafiltração (BENDER, 1986). A acetona foi apontada como problemática, na etapa de precipitação para purificação de CGTase porque esse método permitia a presença de enzimas hidrolíticas indesejáveis (BERNA, 1990; citado por MATIOLI, 2000).

Schwimmer e Garibalde (1950), citados por Berna (1990), seguidos por Norberg e French (1950) produziram uma enzima próxima da homogeneidade e livre de enzimas hidrolíticas, por ultrafiltração e por adsorção da CGTase em amido, seguida por dissociação fracionada com etanol e precipitação com sulfato de amônio. Esse método permitiu concentrar a enzima 64 vezes (MATIOLI, 2000).

Vretblad (1974), citado por Matioli (2000) demonstrou um processo para imobilizar ligantes para cromatografia de afinidade bioespecífica. Ele conseguiu imobilizar, diretamente, ligante contendo grupos hidroxil no gel de Sepharose 6B, o qual foi previamente ativado com um epóxido bifuncional. O método empregou como ligante a  $\alpha$ -CD e, segundo ele, outros ligantes contendo grupos hidroxil poderiam ser usados.

László et al (1981), citado por Matioli (2000) utilizaram a cromatografia de afinidade com  $\alpha$ -CD como ligante e gel Sepharose 6B para purificação da CGTase, o que permitiu obter o fator de purificação de 113, com um rendimento de 90%.

Linagem	Meio	Referência
<i>Bacillus</i> sp. G1	1,0% amido de mandioca; 0,5% peptona; 0,5% extrato de levedura; 0,1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,02% MgSO <sub>4</sub> ; 1,0% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .	SIAN et al. 2004.
<i>Bacillus firmus</i>	2,0% amido solúvel; 0,5% peptona; 0,5% extrato de levedura; 0,1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,02% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; pH 10,5.	HIGUTI et al. 2004.
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain ST-12K	1,0% amido de batata; 1,0% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1,0% NaCl; 10mM MgSO <sub>4</sub> .	DOUKYU et al. 2003.
<i>Bacillus firmus</i> strain n° 37	1,0% maltodextrina; 0,5% polipeptona; 0,35% extrato de levedura; 0,1% K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,02% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; 1,0% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; pH 10,0.	MATIOLI et al. 2002.
<i>Bacillus firmus</i>	Meio seletivo: 1,0% amido solúvel; 0,5% polipeptona; 0,5% extrato de levedura; 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,01% corante vermelho corngo; 1,0% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 1,5% agar.	ALVES et al. 2002.
<i>Bacillus agaratphaerens</i> LS-3C	Meio produção: 2,0% amido solúvel; 0,5% polipeptona; 0,5% extrato de levedura; 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,02% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; 1,0% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .	MARTINS e HATTI-KAUL, 2002.
<i>Bacillus</i> sp. 7-12	10,0% amido solúvel; 5% extrato de levedura; 5% peptona; 5% casamino ácido (Hidrolisado de caseína); 10% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 300 µL de elementos traços; pH 10,2.	CAO et al. 2005.
<i>Bacillus</i> alcalofílico CGII	Fermentação em frascos agitados: 2,0% amido solúvel; 0,5% peptona; 0,5% extrato de levedura; 0,1% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,2% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; 1,0% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .	FREITAS et al. 2004.
<i>Bacillus</i> G1	Fermentação em fermentador: 2,0% amido de milho; 5,0% extrato de levedura; 5,0% steep de milho; 0,1% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,2% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; 1,0% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .	IBRAHIM et al. 2005.
<i>Bacillus</i> sp. TS1-1	1,5% amido solúvel; 1,5% polipeptona; 1,5% extrato de levedura; 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,02% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; 1,0% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; pH 10,5.	ZAIN et al. 2006.
<i>Bacillus stearothermophilus</i> HR1	Meio otimizado: 1,0% amido solúvel; 0,5% peptona; 0,5% extrato de levedura; 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,02% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; 1,0% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; pH 10,5.	RAHMAN et al. 2004.
<i>Bacillus</i> sp subgrupo alcalophilus E16	Meio selecionado: 2,0% amido de milho; 1,0% extrato de levedura; 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,02% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; 10% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .	ALVES-PRADO et al. 2000.
<i>Bacillus stearothermophilus</i> R2	Meio seleção: 2,0% amido solúvel; 1,75% peptona de carne; 0,5% extrato de levedura; 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,02% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; 0,005% CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O; pH 7,2.	KABAIVANO VA et al. 1999.
<i>Bacillus</i> sp (ATC 21783)	Meio otimizado: 2,0% amido de milho; 1,75% peptona de caseína; 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,02% CaCl <sub>2</sub> ; pH 7,2.	TURNES E BAHAR, 1996.
<i>Bacillus cereus</i> AJ30 (NCIMB 13123)	Meio otimizado: 1,35% amido solúvel; 0,49% peptona; 0,59% extrato de levedura; 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,02% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; pH 10,10.	RAMAKRISHNA et al. 1994.
<i>Bacillus cereus</i> AJ30 (NCIMB 13123)	2,0% amido; 0,5% peptona; 0,5% extrato de levedura; 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,02% MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; pH 9,0.	JAMUNA et al. 1993.
<p>4,0% caldo de maceração de milho; 1,0% amido batata; 0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,02% MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 1,0% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1,0% flocos de trigo ou flocos de arroz.</p> <p>Fermentação submersa: 1,5% glicose; 0,5% peptona; 0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,02% MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; pH 7,0.</p> <p>Fermentação em substrato sólido: 10g farelo de trigo + 50 mL de meio líquido. (Erlenmeyer 1000 mL, inclinado).</p> <p>Fermentação "slurry": 10g farelo de trigo + 100 mL de meio líquido (Erlenmeyer 125 mL, agitação).</p> <p>Fermentação submersa com extrato de farelo de trigo: 100 mL de extrato de farelo de trigo + componentes de meio sem glicose.</p> <p>1,5% glicose; 0,5% peptona; 0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,02% MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; pH 7,0.</p>		

**Tabela 2 .** Composição dos meios utilizados para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase).

Bergsma et al (1988) utilizaram a metodologia de László et al (1981) para purificar a CGTase de *Bacillus circulans*. Essa enzima produziu, predominantemente,  $\beta$ -CD (67%  $\beta$ -CD; 18%  $\alpha$ -CD e 15%  $\gamma$ -CD). Após uma ultrafiltração, a cromatografia de afinidade foi realizada em gel de Sepharose 6B e  $\alpha$ -CD como ligante. Apesar de ser uma  $\beta$ -CGTase, a enzima apresentou uma boa afinidade pelo ligante, com um rendimento final de 90,3%.

A purificação da enzima por cromatografia de afinidade bioespecífica é baseada na formação de um complexo seletivo e reversível entre a proteína a recuperar e uma outra molécula ligada, freqüentemente denominada ligante. A afinidade, entre a molécula de interesse e o ligante, somente existe quando há reconhecimento molecular entre as duas espécies. Os ligantes bioespecíficos apresentam as seguintes vantagens: (i) fornecem um grau de especificidade extremamente elevado e, portanto, uma pureza elevada do produto; (ii) uma separação rápida e geralmente em uma única etapa e (iii) um rendimento em proteína também elevado, uma vez que a enzima é protegida da desnaturação por estabilização da estrutura terciária (BERNA, 1990; citado por MATIOLI, 2000).

Ferrarotti et al (1996) purificaram a CGTase produzida por *Bacillus circulans* DF 9, a qual foi submetida a uma adsorção em amido e a uma cromatografia de afinidade em coluna  $\alpha$ -CD-Sepharose 4B. A partir desta foi obtida uma CGTase produzida por *Bacillus circulans* DF 9 tipo R purificada 38 vezes com apenas uma cromatografia de afinidade em coluna  $\alpha$ -CD-Sepharose 4B, com um rendimento de 79%. A CGTase produzida por *Bacillus circulans* nº 76 foi purificada por adsorção de amido, obtendo um fator de purificação de 91 vezes e um rendimento de 51%. Essa CGTase apresentou atividade nos pH ótimos 5,4 e 8,2. A máxima atividade em pH 5,4 ficou entre 60°C e 65°C, enquanto em pH 8,2 foi entre 60°C e 70°C (SALVA et al, 1997).

Um resumo das características físico-químicas e bioquímicas de CGTase produzidas por diferentes microrganismos está listado na tabela 3.

**Tabela 3.** Características físico-químicas da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) produzida por diferentes espécies microbianas.

Linhagem	Temperatura ótima (°C)	Temperatura estabilidade	pH ótimo		pH estabilidade	Massa molecular (kDa)	pI	K <sub>m</sub> (mg/ml)	V <sub>máx</sub>	Referência
			-Ca <sup>+2</sup>	+Ca <sup>+2</sup>						
<i>B. agaradhaerens</i> LS-3C	55	30	40	9,0	5,0-11,4	110 / 112	6,9	18,0±4,8 <sup>a</sup>	20,2±1,4 <sup>a</sup>	MARTINS E HATTI-KAUL, 2003
<i>B. amiloquefaciens</i> AL35	70	60	60	4,0 e 7,0	4,0-7,0	ND		21,2±6,1 <sup>b</sup>	7,4±6 <sup>b</sup>	YU et al, 1988
<i>B. autolyticus</i> 11149	60	40	40	5,0-6,0	5,0-9,0	68 / 70				TOMITA et al 1993
<i>B. circulans</i> C31	60	50	50	5,5	5,5-9,0	103				PONGSWASDI e YAGISAWA, 1988
<i>B. circulans</i> DF9R	60	-	-	55	6,5-8,5	78	5,3			MARÉCHAL et al, 1996
<i>B. circulans</i> E192	60	45	45	5,5-5,8	6,0-9,0	78	6,9 e 6,7	0,70±0,04	43±1,2 <sup>a,c</sup>	BOVETTO et al, 1992
<i>B. clarkii</i> 7364	60	40	40	10,5 e 11,0	6,0-11,0	75		0,57±0,03 <sup>c</sup>		TAKADA et al 2004
<i>B. coagulans</i>	65	65	65	6,5	5,0-10,0	36				citado ABELYAN et al, 1995
<i>B. firmus</i> n° 324*	65	55	70	7,5-8,5	6,5-9,0	75				YIM et al, 1997
<i>B. firmus</i> (NCIM 5119)	65	30	30	5,5-8,5	7,0-11,0	78 / 82		1,21 <sup>b</sup>		GAWANDE et al, 1999
<i>B. firmus</i> n°75	60			5,5-8,5	---	ND				HIGUTI et al, 2003

<i>B. lentus</i>	45-50	55	6,5-7,5	6,5-8,5	33	SABIONI e PARK, 1992a e 1992b
<i>B. licheniformis</i>	-	60	5,0-6,0	6,0-8,0	72	citado ABELYAN et al, 1995
<i>B. macerans amilase</i> (IFO)	55	60	5,0-5,7	7,0-10,0	ND	KITAHATA & OKADA (1974)
<i>B. macerans</i> IAM 1243	60	50	6,0; 5,5-7,5	5,5-9,5	145	KOBAYASHI et al, 1978
<i>B. megaterium</i> n°5	55	55	5,2-5,7	7,0-10,0	75	KITAHATA et al, 1974; citado VIHINEN et al, 1989
<i>B. stearothermophilus</i> BKPM V-4905	50	70	6,5	5,0-10,0	68	citado ABELYAN et al, 1991 e 1992
<i>B. stearothermophilus</i> ET1	80	70	6,0	6,0-8,0	66,8	CHUNG et al, 1998
<i>B. subtilis</i> 313	65	50	8,0	6,0	64	KATO e HORIKOSHI, 1986
<i>Bacillus</i> sp 1919	55-60	50	4,0	5,0-8,0	42	citado STARNES, 1990
<i>Bacillus</i> sp A2	85	55-60	8,5	6,0-10,0	82	ABELYAN et al, 1992
<i>Bacillus</i> sp A2-5a	50-55	45-60	5,5	6,0-9,0	80 / 70	ABELYAN et al, 1992
<i>Bacillus</i> sp A-7/1	60-70	65	6,5	5,0-8,0	93	KOMETANI et al, 1994
						ABELYAN et al, 1992

<i>Bacillus</i> sp A8	68	55-60	9,0	6,0-11,0	90		ABELYAN et al, 1992
<i>Bacillus</i> sp AL-6	55-60	40	8,0	5,0-8,0	74	entre 3,0 e 4,0	FUJITA et al, 1990
<i>Bacillus</i> sp ATCC21783 (alcalofílico)	-	65	4,5-4,7	6,0-10,0	88		NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976a
<i>Bacillus</i> sp ATCC 21783 (alcalofílico)	50	60	7,0 e 8,0-9,0	6,0-9,0	85 / 88		NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976b
<i>Bacillus</i> sp ATCC21783	55	-	5,0; 7,0 e 9,0	-	ND		VIHINEN e MÄNTSÄLÄ et al, 1989
<i>Bacillus</i> sp G1	60	60	6,0	6,0-9,0	70	0,15 <sup>d</sup>	SIAN et al, 2005
<i>Bacillus</i> sp T17	50-75	60	8,0	5,5-9,0	70		ABELYAN et al, 1992
<i>Bacillus</i> sp T42	50-75	70	6,5	6,0-9,0	69		ABELYAN et al, 1992
<i>Brevibacterium</i> sp n °9605	45	30	10,0	6,0-8,0	75 / 86		MORI et al, 1994
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AS-22	45	35	7,0-7,5	5,5-9,0	72	7,3 1,35 <sup>b</sup>	GAWANDE e PATKAR, 2001
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	-	45	-	6,0-7,5	69		citado VIHINEN e MÄNTSÄLÄ et al, 1989 e YIM et al, 1997
Linhagem n °37	50	-	8,0	-	77,58		MATIOLI et al, 1998

<i>Micrococcus</i> sp (ATCC 31606)	55-65	50	5,5-6,5 e 10,0	-	88	Citado STARNES, 1990
<i>Micrococcus luteus</i>	-	50	5,0-8,0	5,0-9,0	85 / 120	citado ABELYAN et al, 1995
<i>Micrococcus varians</i>	-	50	5,0-8,0	5,0-9,0	85 / 120	citado ABELYAN et al, 1995
<i>Micrococcus varians</i> M 849	55-65	45	5,0-8,0	5,0-9,0	85	YAGI et al, 1980 citado LARSEN et al, 1998b
<i>Paenibacillus</i> sp F8	50	40	7,5	6,0-8,0	72	LARSEN et al, 1998c
<i>Thermoactinomyces</i> sp INMIA - A-554	-	80	6,0-7,0	5,5-8,5	66	ABELYAN et al, 1995
<i>Thermoactinomyces</i> sp INMIA - A-561	-	70	6,0-7,0	5,5-8,5	64	ABELYAN et al, 1995
<i>Thermoanaerobacter</i> sp- ATCC53627	95	80	5,0	5,0-6,7	103	STARNES, 1990; ZAMOST et al, 1991
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i> EM1	80-85	70	4,0-7,0	-	68	WIND et al, 1995
<i>Thermococcus</i> sp B1001	90-100		5,0-5,5	4,0-6,0	83	TACHIBANA et al, 1999
<i>Anaerobranca gottschalkii</i>	65	60	8,5	6,0-9,0		THIEMANN et al, 2004
<i>Bacillus clausii</i> E16	55	50	6,0	6,0-11,0	75	presente estudo
<i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3	65	55	6,5	6,0-11,0	70	presente estudo

ND: não determinado; a) maltodextrina; b) amido solúvel; c) amido de trigo; d) β-ciclodextrina

## Aplicações da CGTase

A mais importante aplicação da CGTase é na síntese de ciclodextrinas, devido à suas características e sua ampla aplicação industrial. Mas a enzima CGTase pode ainda ser usada na síntese de oligossacarídeos lineares e seus derivados pelas reações de acoplamento e desproporcionamento.

Tem sido relatado o uso de CGTase junto a uma variedade de carboidratos que atuam como aceptores na reação. A CGTase produzida por *Bacillus* sp alcalofílico em presença de neohesperidina e amido solúvel como aceptores, produziu neohesperidina monoglicosídeo e uma série de maltooligoglicosídeos por reação de transglicosilação. A solubilidade de neohesperidina monoglicosídeo em água é aproximadamente 1500 vezes maior que a neohesperidina, enquanto que a redução do sabor amargo foi cerca de 10 vezes menor. Já em presença de naringina foi obtida a naringina 3G- $\alpha$ -D-glicopiranosil, e a naringina monoglicosídeo apresentou um aumento na solubilidade em água de aproximadamente 1000 vezes, mas não houve alteração no sabor amargo (KOMETANI et al, 1996).

A CGTase em presença de D-lactose foi usada para a síntese de um novo trissacarídeo não redutor, O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1,4)-O- $\beta$ -D-glicopiranosil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo (SHIBUYA et al, 1993). Já o composto O- $\alpha$ -glicosiltiamina foi obtido a partir da mistura de reação com CGTase produzida por *B. stearothermophilus* e glucoamilase produzida por *Rhizopus* sp, tiamina e dextrinas como aceptores. Esse novo composto apresentou odor reduzido e sabor adocicado e não apresentou sabor adstringente na língua (UCHIDA & SUZIKI, 1998).

Jun et al. (2001) estudaram a produção de 2-O- $\alpha$ -D-glicopiranosil L-ácido ascórbico (AA-2G) em presença de CGTase produzida por *Paenibacillus* sp. A produção de AA-2G foi analisada em presença, não somente em presença de CGTase, mas também com CGTase +  $\alpha$ -glicosidade de semente de arroz, usando dextrinas como doadores glicosil e o ácido ascórbico comoceptor, apenas a glicose não é indicada como doador glicosil para a síntese de AA-2G.

Há também dados da literatura especializada sobre o uso da enzima CGTase sendo aplicada para sacarificação de amido e produção de oligossacarídeos, através de sua ação hidrolítica, tendo como objetivo diferentes fins tanto na indústria de alimentos quanto farmacêutica. A CGTase, junto à enzima alfa-amilase, é comumente usada na sacarificação de amido e, tem sido observado que a

combinação de ambas promove acréscimo na produção de açúcares livres (DEL RIO et al., 1997). A CGTase é aplicada ainda na hidrólise de amido para obtenção de sacarídeos fosforilados, que são capazes de reagir com minerais como cálcio, magnésio e ferro para formar complexos, que evitam a insolubilização destes minerais na alimentação animal (KAMASAKA et al., 1999).

Uma aplicação comum da enzima já mencionada, está na obtenção de oligossacarídeos. Visando uma maior produção destes, Wind e colaboradores (1988) obtiveram uma enzima CGTase mutante F196G Delta DE e quando esta foi comparada a CGTase parental, apresentou as atividades de ciclização, ligação e desproporcionamento drasticamente reduzidas no mutante, mas sua atividade sacarificante dobrou, alcançando níveis mais elevados que aqueles reportados para a CGTase parental. Sob condições industriais, CGTase converte amido em 35% de CD e 11% de oligossacarídeos (glicose, maltose e maltotriose), enquanto o mutante F196G Delta DE converteu amido em 21% de CD e 18% de oligossacarídeos lineares (WIND et al., 1988)

Plou e colaboradores, em 2002, observaram o potencial biotecnológico de duas glicosiltransferases, especialmente com relação à síntese de oligossacarídeos. Neste trabalho a CGTase utilizada usou o amido como doador e os compostos: glicose, maltose e a sacarose, como aceptores da reação. O grau de polimerização dos oligossacarídeos formados apresentou-se intrinsecamente controlado pela proporção de amido/acceptor disponível na solução. Os oligossacarídeos formados foram estudados e classificados como constituintes dos oligossacarídeos não digestíveis nutricionalmente, com propriedades pré-bióticas relacionadas com a estabilização e melhoria da microbiota do trato gastrointestinal, sendo esses oligossacarídeos empregados largamente na indústria de alimentos.

Em pesquisa realizada por Martin e colaboradores (2004), a CGTase produzida por *Thermoanaerobacter* sp. foi imobilizada covalentemente sobre Eupergit C e usada para a síntese de maltoligossacarídeos frutofuranosídeos empregando-se amido solúvel como doador e sacarose como acceptor. Usando a proporção amido/sacarose de 1:2 a conversão do amido ao produto final, pela ação da CGTase imobilizada, foi maior que 80% em 48 h. Nestas condições, a reação se mostrou seletiva para a formação de matosil frutofuranosídeo.

Outra aplicação da CGTase está na transglicosilação de esteviosídeos que são substâncias isoladas da planta *Stevia rebaudiana*. Este composto possui a

capacidade 250 a 300 vezes maior de adoçar que o açúcar comum, além de ter baixo valor calórico, podendo ser usado como adoçante natural. Entretanto, o potencial deste composto é empalidecido pelo residual sabor amargo que possui e baixa solubilidade. Este sabor amargo pode ser removido pela modificação do esteviosídeo através da reação de transglicosilação intermolecular catalizada por várias enzimas, dentre elas a CGTase. Nesta reação de transglicosilação catalisada pela CGTase outros carboidratos são ligados as posições C<sub>13</sub> e C<sub>19</sub> deste composto, sendo que o número de glicoses unidas a estas posições é que determina o poder adoçante do esteviol. Das várias enzimas testadas por este autor a CGTase do *Bacillus macerans* foi a que apresentou o melhor resultado, tendo sido o amido usado como doador, e obteve o maior grau de remoção dos resíduos amargos como também o aumento de solubilidade do esteviol. (ABELYAN et al., 2004).

Outros pesquisadores como Kim e Yook (1997) também estudaram os efeitos da concentração de CGTase sobre a porcentagem de transglicosilação de esteviosídeos utilizando a maltodextrina como co-substrato na obtenção de compostos como glicosil-esteviosídeo e rebandiosídeo. Estes compostos tiveram sua produção significativamente afetada pela temperatura, proporção de maltodextrina: esteviosídeo, pH, equivalente de dextrose (DE) de maltodextrina e concentração do esteviosídeo. As condições ótimas encontradas para o processo foram: temperatura de 80°C, a razão maltodextrina: esteviosídeo igual a 1, pH 6,0 e DE de 15, quando se obteve glicosil-esteviosídeo, com poder adoçante superior ao esteviosídeo.

Kim et al. (1997) estudaram a utilização de xilitol, inositol, sorbitol, maltitol e lactitol, como aceptores de grupos glicosídicos através da transglicosilação com CGTase. A síntese de glicosil-maltitol, usando amido como doador de grupo glicosídico e maltitol comoceptor, mostrou-se alta e dois produtos foram identificados, maltotriol e maltotetraol.

A produção de uma série de glicosil-trealoses através da transglicosilação com ciclomaltohexose como doador e trealose como receptor de grupos glicosídicos foi observada pela aplicação de CGTase de *Bacillus stearothermophilus* (KURIMOTO et al., 1997).

A ligação de glicose e 6-deoxi-6-iodo-ciclomaltoheptose pela ação da CGTase, na presença de glicoamilase, seguida por acetilação produziu maltoligossacarídeos (APPARU et al., 1995). Já a glicosilação de D-catequina por

CGTase produziu o composto D-catequina-3'-O'- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo, que inibe a ação da tirosinase de cogumelos em presença de 5,8 mM do composto (FUNAYAMA et al., 1993, 1997).

Há ainda relatos da utilização da CGTase na indústria alimentícia, na preparação de massas de produtos de panificação, onde a incorporação da enzima na massa provocaria o aumento do volume do produto de panificação (VAN EIJK & MUTSAERS, 1999; VAN DER VEEN et al., 2000a; VAN DER MAAREL et al., 2002)

Van Eijk e Mutsaers, em 1999, patentearam um processo de utilização da CGTase na massa de produtos de panificação, em substituição ao uso de CDs, com o intuito de promover um maior volume e melhor aeração na massa desses produtos, eliminando assim os inconvenientes da utilização direta de  $\beta$ -CDs em massas de panificação que, apesar de promoverem um aumento do volume desses produtos e uma melhor aromatização, apresentam problemas de tornarem a massa extremamente pegajosa e portanto de difícil manuseio das máquinas envolvidas na produção desses produtos de panificação.

Mais recentemente, são encontrados trabalhos onde a CGTase é utilizada em produtos de panificação com o intuito de retardar o envelhecimento desses produtos (LEE et al., 2002; SHIM et al., 2004) e para melhorar a reologia e a qualidade da farinha de arroz, utilizada na produção de produtos de panificação para pessoas que possuem intolerância ao glúten (GUJRAL et al., 2003).

Em 2006, Kragh e colaboradores patentearam uma CGTase modificada geneticamente que também foi aplicada em produtos de panificação, visando atuar no retardamento do envelhecimento e na melhoria do volume e das características organolépticas destes produtos.

Outra aplicação está na produção de etanol e dextrose, onde foi observado a utilização de uma nova CGTase produzida anaerobicamente por grupos de *Thermoanaerobacter* ou *Thermoamaerobium*. A enzima obtida destes microrganismos mostrou-se mais termoestável que as CGTase já conhecidas, apresentando uma temperatura ótima próxima de 95°C. Esta enzima pode ser usada na liquefação do amido em pH 4,5 e em temperaturas que excedem 100°C, sendo portanto utilizada na obtenção de dextroses e etanol. A enzima mencionada ainda mostrou-se efetiva na formação de CDs a temperaturas de 80-90°C (STARNES, 2001).

Encontram-se também relatos de outras aplicações industriais da enzima CGTase, como na produção de papéis, onde é usada nos processos de formação da superfície e revestimento do papel, obtendo um melhoramento da qualidade do mesmo, com um papel de maior brilho e melhor superfície de impressão (BRUINENBERG et al., 1996; VAN DER VEEN et al., 2000a).

O emprego da enzima CGTase ainda é relatado com relação a aplicações em detergentes e outros agentes de limpeza, onde o uso desta enzima como um dos componentes do produto mostrou-se excelente na remoção de manchas e sujeiras que continham substâncias amilolíticas e no controle do mau odor, e quando aplicada em produtos específicos de lavanderia mostrou excelente na manutenção do branqueamento (SMETS & PINTENS, 2002).

A patente de Maurer e colaboradores (2003) também relata uma nova enzima, obtida a partir do *Bacillus agaradherens*, que foi definida tanto como uma CGTase como uma  $\alpha$ -amilase, pois esta exibe ação hidrolítica, ciclização, transglicosilação e desproporcionação. Esta enzima foi empregada em detergentes e agentes de limpeza que apresentaram uma grande eficiência quando empregados em produtos têxteis (remoção de partículas e grãos de amido em tecidos) e em superfícies de difícil limpeza.

### **CICLODEXTRINAS (CDs)**

O primeiro trabalho referente ao isolamento de uma substância reconhecida como CD foi feito em 1891 por Villiers (SINGH et al., 2002). Schardinger, em 1903, foi o responsável pela primeira descrição detalhada da preparação e isolamento destes oligossacarídeos cíclicos. A primeira patente com CDs foi registrada em 1953 por Freudenberg *et al.*, e já inferia sobre sua possível utilização em medicamentos baseada na sua capacidade de incrementar a solubilidade e estabilidade de fármacos (SÁ BARRETO & CUNHA FILHO, 2008).

A substância cristalina foi denominada “celulosina” porque tinha aparência de celulose (ARMSPACH et al., 1999; MATIOLI et al., 2000).

Entre 1903 e 1911, Schardinger observou que uma linhagem de *Bacillus* chamada II, isolada de alimentos deteriorados, era resistente ao calor e tinha a capacidade de fermentar o amido com produção de duas dextrinas cristalinas. Uma delas era formada por cristais hexagonais, dextrina A, e a outra por prismáticos,

dextrina B. Estas dextrinas não apresentaram poder redutor. Schardinger observou ainda, que a dextrina B era semelhante à celulosina de Villiers. Em 1904, Schardinger isolou a linhagem do *Bacillus macerans*, que, quando cultivado na presença de amido, produzia grandes quantidades de dextrinas cristalinas A e B, as quais foram denominadas de dextrina cristalina  $\alpha$  e dextrina cristalina  $\beta$ . Schardinger também publicou a primeira descrição detalhada para a preparação e isolamento desses oligossacarídeos cíclicos (FRENCH, 1957).

Por volta dos anos 30 até o início dos anos 70, a estrutura das CDs foi elucidada por Freudenberg e seu grupo. As propriedades de formação de complexos de inclusão foram estudadas, e numerosos derivados preparados, e ainda, diversas enzimas caracterizadas. Dentre os muitos pesquisadores, os nomes Cramer e French marcaram esse período (MATIOLI et al., 2000).

Devido aos altos custos envolvidos, no final dos anos 60, a maior refinadora de milho americana abandonou a produção de CDs. Desde então, numerosas opções para a produção de CDs, por ação enzimática no amido, foram propostas na literatura e os processos de purificação foram aprimorando-se (PSZCZOLA, 1988).

As CDs passaram a ser utilizadas na indústria alimentícia a partir da década de 70, quando Japão e Hungria iniciaram sua produção com propósitos comerciais (SZEJTLI, 1982; PSZCZOLA, 1988). As CDs foram aprovadas como aditivos específicos na Bélgica, França, Alemanha, Itália, Luxemburgo, Holanda e Espanha. Estudos realizados por Toyoda et al. (1997), relacionados à ingestão de altas doses de  $\beta$ -CD por ratos em 104 semanas, levaram a conclusão de não haver potencial carcinogênico nesta ingestão.

Devido a sua versatilidade e vantajosas propriedades, esta classe de açúcares possui aplicações nas mais distintas áreas. Na indústria agroquímica, a incorporação de CD a fungicidas e pesticidas melhora sua efetividade e reduz a quantidade e a frequência de aplicação (NAIR & SAWANT, 2005). Na empresa cosmética é usado na estabilização e na diminuição da irritação tópica de perfumes, xampus e outras preparações dérmicas (REGIERT, 2006). Variadas aplicações são descritas para a área química, em catálises, sínteses ou com fins analíticos (Berkecz et al., 2006; Fleck et al., 2007). Na indústria alimentar é explorada na encapsulação de óleos, vitaminas e flavorizantes reduzindo sua oxidação e volatilização, ou em processos de separação, como na extração da cafeína de bebidas ou na remoção do colesterol de produtos lácteos (CRAVOTTO et al., 2006).

O mesmo princípio está sendo estudado em sistemas de purificação de ar e água (TERAO et al., 2005). A medida que avançam as pesquisas as contribuições destes açúcares cíclicos parecem ser ilimitadas.

Nos EUA, o U.S. Food and Drugs Administration (FDA) outorgaram à  $\beta$ -CD (2001) e  $\gamma$ -CD (2000) o título de Substances Generally Recognized as Safe (GRAS), sendo liberadas para o uso como aditivo em alimentos e fármacos. Todos os três tipos de CDs ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) são aprovados na Hungria, Japão e Holanda como aditivos diretos em alimentos e medicamentos não-controlados. Na Austrália, a Australia Food Standards Code, permite o uso da  $\beta$ -CD para a extração de colesterol em ovos, mas não na complexação de aromas (PSZCZOLA, 1988; STARNES, 1990, 2001; SHUKLA, 1991; ALLEGRE & DERATANI, 1994, ALVES-PRADO, 2000).

No Brasil, o uso de ciclodextrina é encontrado no medicamento brexin<sup>®</sup>, antigo cicladol<sup>®</sup>, onde temos o complexo  $\beta$ -CD - piroxicam. No mercado brasileiro, ainda, é permitido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a venda e o consumo de aromas complexados em  $\beta$ -CD.

Atualmente, pesquisas sobre a utilização de ciclodextrinas são muito difundidas em várias áreas: alimentos, fármacos, química, cosmética e médica (SINGH et al., 2002). Recentes trabalhos realizados nos Estados Unidos, descobriram que a aplicação da  $\beta$ -CD dentro da vagina de ratos antes da inoculação com células infectadas por HIV reduzem substancialmente a transmissão (KHANNA et al., 2002). Na Espanha, pesquisas mostraram a utilização do fármaco itraconazol complexado em ciclodextrina no tratamento de dermatoses fúngicas (PALACIO et al., 2002).

Há aproximadamente 30 anos, eram publicados, por mês de 8 a 10 artigos e patentes referentes à CDs. Há 10 anos, esse número aumentou para a faixa de 20 a 25 publicações mensais e, até julho de 1996, cerca de 130 novos artigos, patentes e resumos em conferências foram dedicados a essa molécula, mensalmente. Em 1996, o número de publicações referentes às CDs foi avaliado em cerca de 13.000 (SZEJTLI, 1997). O número de publicações e patentes tem se expandido exponencialmente a cada década. Das 39.679 publicações, até março de 2007, uma parte significativa está dedicada ao uso farmacêutico das CDs como solubilizantes (BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Segundo os resumos contidos na revista *CD-News*, de janeiro a novembro de 1994, das 1072 publicações listadas, 25,7% foram dedicadas a aplicações

farmacêuticas das CDs; 20% à química analítica, dedicando-se principalmente a separações cromatográficas; 19,4% à química dos complexos de CDs; 17,5% foram dedicados a enzimologia, a efeitos biológicos e à produção de CD natural e modificada; 10% a produtos e processos químicos e bioquímicos; 6% à indústria de alimentos e cosméticos. Apesar do número modesto de publicações científicas, cerca de 70% da CD mundialmente produzida é destinada ao setor alimentício e de cosméticos, necessitando de aproximadamente 20 – 40 toneladas/ano de CD (SZEJTLI, 1997).

A utilização de ciclodextrina complexada a fármacos, aromas e inseticidas vem sendo pesquisada no Brasil. Na UNICAMP, em 2001, foi apresentado um estudo sobre o uso de ciclodextrinas como carreadora de praziquantel (fármaco utilizado no tratamento de esquistossomose e outros helmintos), para melhorar a biodisponibilidade do princípio ativo do fármaco que é pouco solúvel (JESUS et al., 2001) e, em 2003, o estudo de encapsulação de bioaromas de gorgonzola em  $\beta$ -CD foi apresentado em tese de doutorado (MARTINS, 2003). Ainda, na UEM, BERGAMASCO (2003) pesquisou a redução da perda de sulfluramida por sublimação na produção de inseticida, por meio do aumento da estabilidade desta molécula via encapsulação molecular com ciclodextrinas.

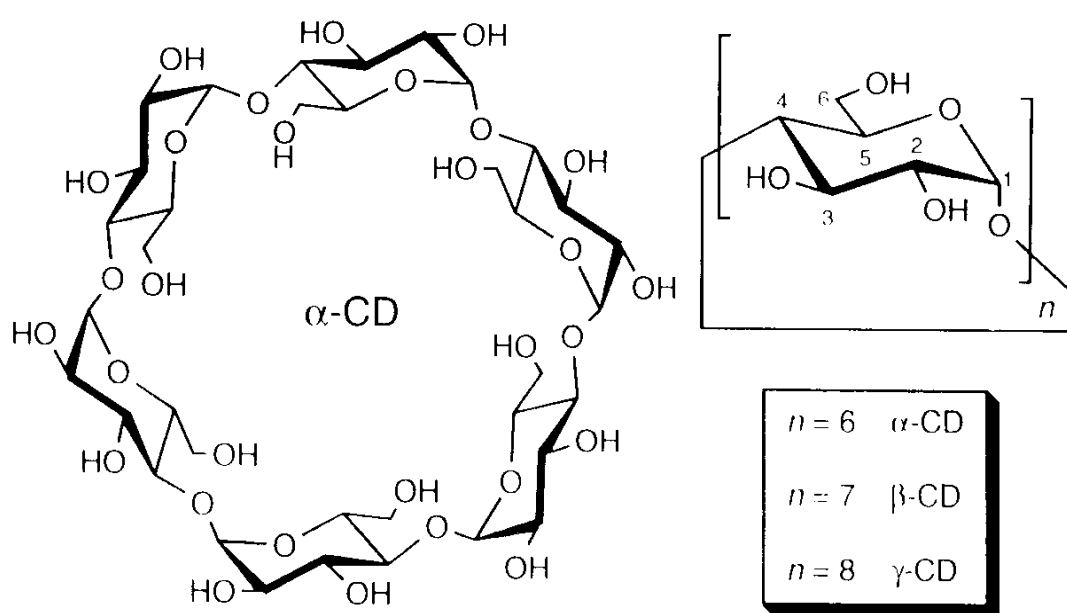
### **Características e propriedades das CDs**

As ciclodextrinas (cicloamilose, ciclomaltose, dextrinas de Schardinger, cG, CDs) são maltooligossacarídeos cíclicos, produzidos a partir do amido, pela ação da CGTase (EC 2.4.1.19) de algumas espécies microbianas. As principais e mais comuns ciclodextrinas são compostas de seis ( $\alpha$ -CD, ciclohexamilose, ciclomaltohexaose, cG<sub>6</sub>), sete ( $\beta$ -CD, cicloheptamilose, ciclomaltoheptaose, cG<sub>7</sub>) e oito ( $\gamma$ -CD, ciclooctamilose, ciclomaltooctaose, cG<sub>8</sub>) unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 (VAN DER VEEN et al., 2000a; SHIBUYA et al., 2003, GAWANDE et al., 2003; SÁ BARRETO & CUNHA FILHO, 2008).

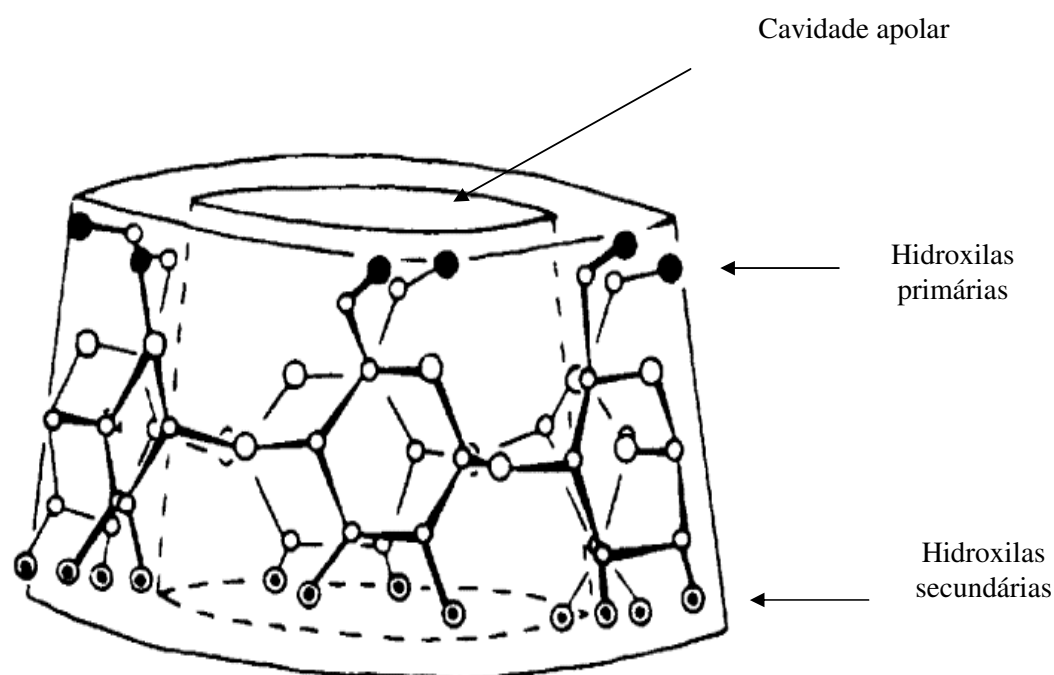
As ciclodextrinas com mais de oito unidades de D-glicose são mais raras, mas FRENCH (1957) já mencionava a existência de ciclodextrinas com até dez unidades de glicose. Entretanto, devido à baixa produção e dificuldade de purificação, estas CDs não foram inteiramente caracterizadas. Somente recentemente, CDs com 9 a

19 unidades de glicose, denominadas de  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ -,  $\theta$ -,  $\iota$ -,  $\kappa$ -,  $\lambda$ -,  $\mu$ -,  $\nu$ - e  $\xi$ -CDs foram caracterizadas e purificadas (LARSEN & ZIMMERMANN, 1999).

Nas ciclodextrinas, os grupos de hidroxilas secundários (nos átomos de carbono  $C_2$  e  $C_3$  das unidades de glicose) estão situados de um lado do anel e todas as hidroxilas primárias (nos átomos de carbono  $C_6$ ) do outro lado (figura 9), (ARMSPACH et al., 1999). O lado das hidroxilas secundárias é mais largo que o lado das hidroxilas primárias. A rotação livre das hidroxilas primárias reduz o diâmetro efetivo da cavidade no lado onde elas ocorrem, enquanto o grupo de hidroxilas secundárias apresenta uma cadeia relativamente rígida, sem rotação. Como conseqüência, as CDs não são moléculas perfeitamente cilíndricas, mas apresentam a forma de cone truncado (figura 10), (PSZCZOLA, 1988; VAN DER VEEN et al., 2000a).



**Figura 9:** Representação química e estrutural da ciclodextrina. **Fonte:** ARMSPACH et al., 1999.



**Figura 10:** Aspecto da estrutura anelar de uma ciclodextrina. **Fonte:** PSZCZOLA, 1988.

Essa conformação molecular faz ainda, com que as CDs apresentem um caráter hidrofílico no lado externo da molécula. Enquanto a superfície externa possui natureza hidrofílica, os pares de elétrons livres dos oxigênios envolvidos em ligações glicosídicas são dirigidos para o interior da cavidade, proporcionando uma elevada densidade eletrônica e, por conseqüência, um caráter apolar (MATIOLI et al., 2000). Tais características possibilitam a formação de complexos de inclusão com várias substâncias orgânicas e inorgânicas, que são encapsuladas na cavidade central da CD, podendo formar cristais. Os complexos de inclusão (encapsulação molecular) são formados e existem em soluções aquosas, permitindo assim, a investigação de substâncias hidrofóbicas muito importantes para os sistemas biológicos (BENDER, 1986; VAN DER VEEN et al., 2000a).

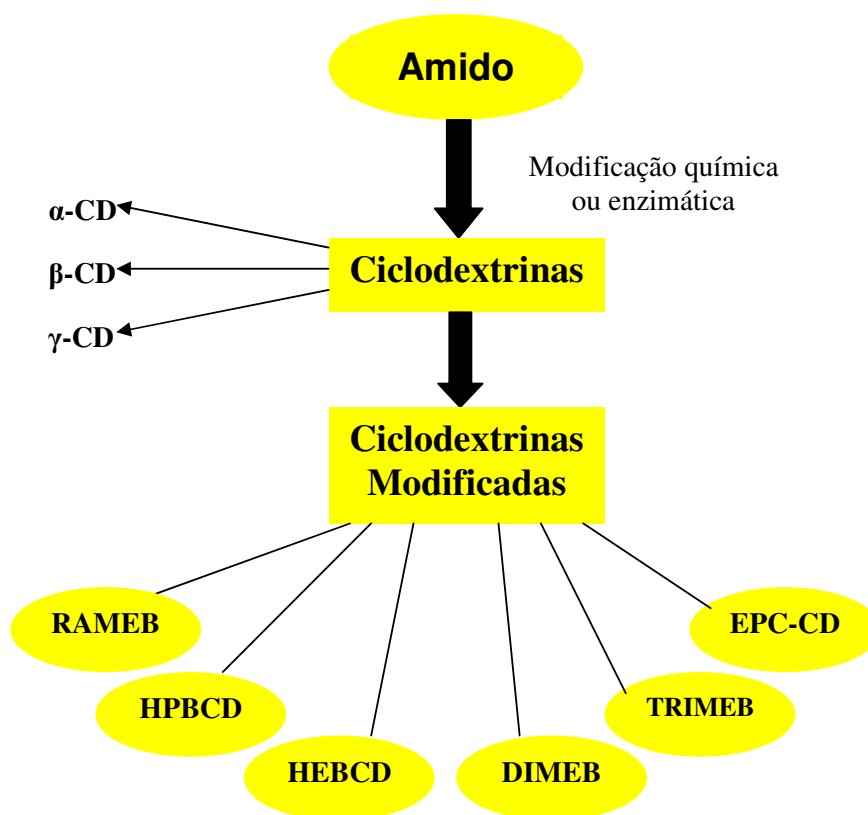
Há muitas pontes de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas secundárias de unidades de glicose consecutivas, tais como os OH em C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>. Essas interações estabilizam o macrociclo das ciclodextrinas e impedem sua hidratação. Por estarem orientadas para fora, as hidroxilas nos átomos C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub> podem sofrer ataque químico que modifica a estrutura das CDs sem alterar a

cavidade central. Isso permite que as ciclodextrinas sejam transformadas em derivados (figura 11), com modificações em suas propriedades físico-químicas (SINGH et al., 2002).

CDs naturais podem ser modificadas para diferentes propósitos, por exemplo, para melhorar a baixa solubilidade aquosa da  $\beta$ -CD e/ou para diminuir a toxicidade em aplicações parenterais. Os grupos hidroxilas das CDs são utilizados como pontos iniciadores das modificações estruturais e vários grupos funcionais têm sido incorporados nas moléculas de CD. Por exemplo, CDs alquiladas e hidroxialquiladas são preparadas para se obter um melhor carreador de fármacos. Outros exemplos são os polímeros de CD e as CDs ramificadas (BEKERS et al., 1991; SINGH et al., 2002, MARTIN DEL VALLE, 2004).

Em comparação com o correspondente maltooligossacarídeo linear, as CDs são moléculas muito estáveis. Pelo fato de serem circulares, não apresentam extremidade redutora e não redutora. Desta forma, as CDs não podem ser degradadas por enzimas com ação do tipo exo. Além das CGTases, apenas poucas enzimas podem abrir o anel das CDs, sendo uma delas as ciclomaltodextrinases (CDase, EC 3.2.1.54) (PARK et al., 2000, HASHIMOTO et al., 2001).

As  $\alpha$ -amilases produzidas por *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus subtilis* var. *amylossachariticus* também conseguem degradar CDs. Já as  $\alpha$ -amilases de *Bacillus coagulans*, *Bacillus macerans*, *Pseudomonas* Msl e glucoamilases de *Flavobacterium* sp hidrolisam apenas as CDs presas ao amido. A exoamilase de *Bacillus stearothermophilus* KP 1064 também é capaz de hidrolisar algumas CDs. Essas moléculas ainda podem ser degradadas por ácidos fortes e por radiação gama (BENDER, 1986; ALVES-PRADO, 2000).



- \*RAMEB: β-ciclodextrina metilada aleatoriamente;
- \*HPBCD: 2-hidroxipropil - β-ciclodextrina;
- \*HEBCD: hidroxietil - β-ciclodextrina;
- \*DIMEB: 2,6-dimetil - β-ciclodextrina;
- \*TRIMEB: 2,3,6-tri-O-metil - β-ciclodextrina;
- \*EPC-CD: ciclodextrina ligada a epíclorohidrina.

**Figura 11:** Tipos comuns de CDs e as CDs modificadas a partir destas. **Fonte:** SINGH et al., 2002.

As dimensões das CDs variam com o número de unidades de glicose. Devido à diferença no diâmetro da cavidade interna, cada CD mostra uma capacidade diferente de formação do complexo de inclusão com outras moléculas (BEKERS et al., 1991). A tabela 4 apresenta algumas importantes propriedades físico-químicas das principais CDs.

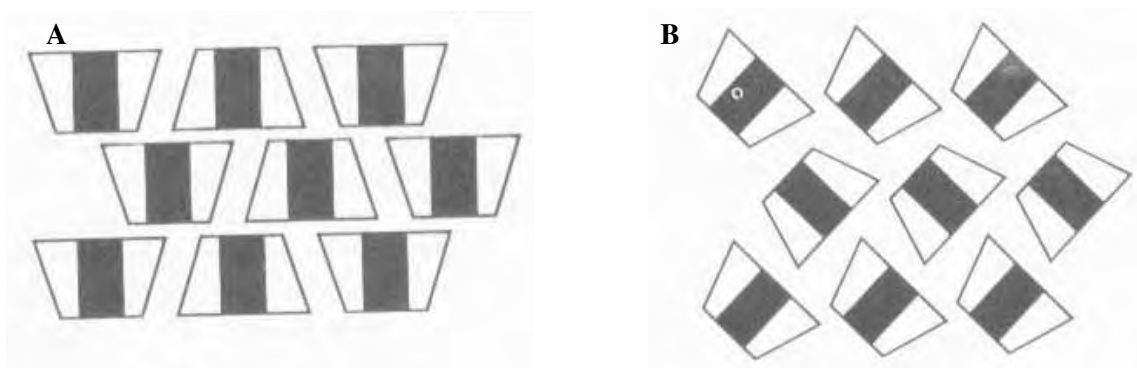
**Tabela 4:** Propriedades físico-químicas das principais CDs.

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>α- CD</b>	<b>β- CD</b>	<b>γ- CD</b>
<b>Monômeros de glicose</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Massa molar</b>	<b>972</b>	<b>1135</b>	<b>1297</b>
<b>Diâmetro da cavidade interna (Å)</b>	<b>5,7</b>	<b>7,8</b>	<b>9,5</b>
<b>Volume da cavidade interna(Å<sup>3</sup>)</b>	<b>174</b>	<b>262</b>	<b>427</b>
<b>Diâmetro externo (Å)</b>	<b>14,6 ± 0,4</b>	<b>15,4 ± 0,4</b>	<b>17,5 ± 0,4</b>
<b>Solubilidade em água (g/L – 25<sup>0</sup>C)</b>	<b>145</b>	<b>18,5</b>	<b>232</b>
<b>Forma dos cristais (60% propanol)</b>	<b>hexagonal</b>	<b>monoclínico</b>	<b>quadrado</b>
<b>Moléculas de água na cavidade</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>17</b>
<b>Rotação específica [α]<sub>D</sub><sup>25</sup></b>	<b>150,5<sup>0</sup></b>	<b>162,5<sup>0</sup></b>	<b>177,4<sup>0</sup></b>

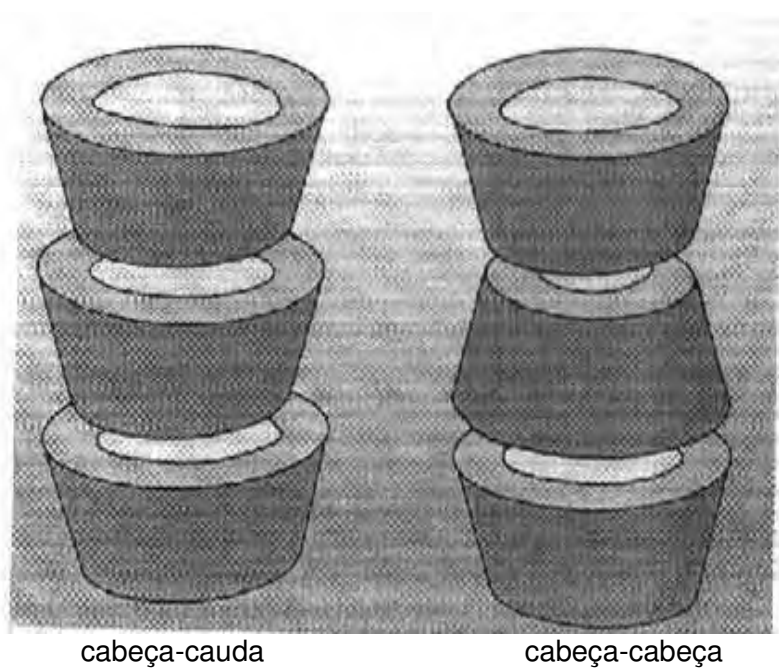
Fonte: ALVES-PRADO (2000).

A solubilidade das CDs aumenta rapidamente com a elevação da temperatura, o que permite uma recristalização fácil quando do abaixamento da temperatura. A disposição de moléculas CD, em arranjo cristalino, pode ser de dois tipos: as moléculas podem arranjar-se formando uma estrutura em gaiola ou em canal. Nas estruturas em gaiola, a cavidade de cada CD é bloqueada dos dois lados pelas moléculas adjacentes de CD, isolando, assim, cada uma das cavidades. Nesse tipo de arranjo cristalino, as CDs podem ser dispostas em padrões com forma de cruz, bloco ou espinha de peixe (figura 12).

Nas estruturas em canal, as moléculas se alinham umas sobre as outras como uma pilha de moedas. As moléculas inclusas ficam dentro dos canais “infinitos”, formados pelo alinhamento linear das cavidades. Esses alinhamentos podem ser “cabeça-cabeça” ou “cabeça-cauda”, como demonstrado na figura 13 (CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995, ARMSPACH et al., 1999).



**Figura 12:** Estruturas em gaiola: bloco (A) e espinha de peixe (B). **Fonte:** ARMSPACH et al., 1999.



**Figura 13:** Estrutura de canal cabeça-cauda e cabeça-cabeça. **Fonte:** CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995.

As CDs não têm ponto de fusão definido, mas começam a se decompor a partir de 200°C. Suas propriedades térmicas exatas dependem do teor de água, da estrutura cristalina, do grau de aquecimento e também da composição da atmosfera (CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995).

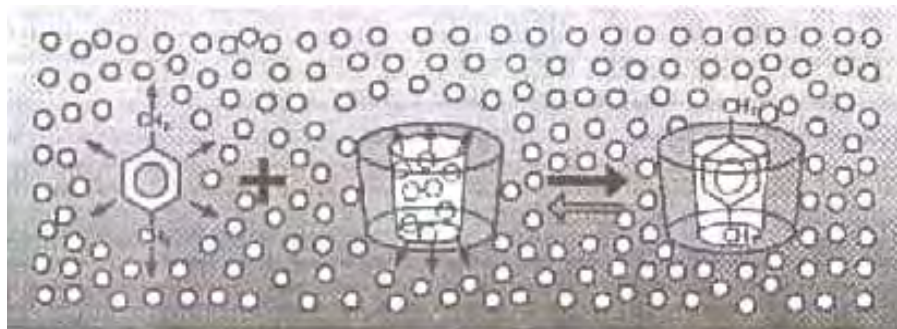
Em meio alcalino, como os demais oligo e polissacarídeos não redutores, as CDs são estáveis. Por outro lado, a hidrólise ácida parcial das CDs produz uma série de maltooligossacarídeos e glicose. Contudo, a resistência à hidrólise ácida das CDs é de 3 a 5 vezes maior (dependendo da temperatura e da acidez) que aquelas das dextrinas lineares correspondentes (BENDER, 1986).

### **Inclusão molecular**

A característica mais marcante das CDs é sua habilidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos, isto é, o aprisionamento de várias moléculas externas (moléculas hóspedes) dentro da cavidade de uma CD (molécula hospedeira). A necessidade mínima para a formação desse complexo de inclusão é que a molécula hóspede deve se adequar inteiramente, ou ao menos parcialmente, dentro da cavidade da CD (MATIOLI et al., 2000; SINGH et al., 2002).

Complexos estáveis não são formados com moléculas hóspedes pequenas, porque estas escapam do interior da cavidade. Também é impossível a formação de complexos com moléculas que não possam penetrar na cavidade das CDs, mas, se certos grupos ou cadeias laterais da molécula volumosa conseguem se acomodar na cavidade da CD, a formação do complexo de inclusão se torna possível. Usualmente, são formados os complexos 1:1 (CD: hóspede), mas, quando uma molécula hóspede é muito longa para se acomodar em uma cavidade, e a sua outra extremidade também é responsável pela formação do complexo, assim, podem ser formados os complexos 2:1; 2:2; 3:1; 3:2; 4:5, etc. Contudo é possível formar complexos 1:2 (CD: hóspede), isso é muito comum nas  $\gamma$ -CDs, devido ao maior diâmetro de sua cavidade interna, quando comparada as outras CDs. Não somente à estequiometria, mas também a polaridade das moléculas hóspedes determinam se a inclusão pode ocorrer. Em geral, moléculas hidrofóbicas ou alguns resíduos hidrofílicos tem a mais alta afinidade pela cavidade da CD em solução aquosa (BEKERS et al., 1991).

Na ausência da molécula hóspede, a cavidade hidrofóbica é ocupada por moléculas de água. Contudo, uma molécula hóspede específica, quando adicionada à solução de CD, expulsa as moléculas de água e ocupa ela própria esta cavidade. A figura 14 apresenta um exemplo típico de complexação, em que moléculas de água internas à cavidade da CD no início da reação são substituídas pela molécula de *p*-xileno (CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995; VAN DER VEEN et al., 2000a)



**Figura 14:** Representação esquemática da formação do complexo de inclusão em ciclodextrina. **Fonte:** CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995.

Segundo Tabushi e colaboradores (1978), as CDs exibem um comportamento semelhante ao de uma enzima, em relação ao substrato ligante, sugerindo que existe uma interação específica entre a ciclodextrina e a molécula hóspede. Ainda existem muitas dúvidas a serem esclarecidas, tais como a natureza da força de ligação, a natureza da estrutura da água em torno ou próxima do complexo de inclusão, a dinâmica molecular de inclusão, entre outras. Esses autores, pesquisando a encapsulação molecular, concluíram que as interações de Van der Waals, a energia de conformação e os grupamentos de água governam o processo de inclusão (MATIOLI et al., 2000).

Um dos principais campos de aplicação das CDs na indústria de alimentos, com relação à inclusão de componentes, está relacionada a inclusão de agentes aromatizantes, freqüentemente de alto valor comercial, e à extração do colesterol de certos alimentos, por meio do processo de inclusão deste nas CDs. Outras aplicações na indústria de alimentos estão relacionadas a: adoçantes, extratos de plantas, óleos, vitaminas e anti-sépticos. Na prática, a inclusão pode aumentar a estabilidade da molécula hóspede frente ao calor, levando à diminuição da volatilidade ou aumentando a resistência térmica. Pode, também, aumentar a estabilidade frente à oxidação e, ainda, diminuir o poder irritante ou disfarçar o gosto amargo e cheiros desagradáveis de determinados compostos. Para compostos relativamente insolúveis em água, a inclusão pode melhorar a solubilidade e a cinética de dissolução (SINGH et al., 2002).

## **Ciclodextrinas em alimentos**

Os três tipos de CDs tem aprovação para o uso como ativos em alimentos e medicamentos alguns países, mas devido a estrutura, tamanho da cavidade, condição de aprovação e de custos, a  $\beta$ -CD é o tipo mais utilizado nos processos industriais (SÁ BARRETO & CUNHA FILHO, 2008; ZHEKOVA et al., 2009).

A  $\beta$ -CD é a mais utilizada nos processos industriais, e obteve, em 1998, o título de “Substances Generally Recognized as Safe” (GRAS), sendo liberada para o uso como aditivo em alimentos e fármacos nos EUA. Outras CDs, ou as derivadas das mesmas, são pouco utilizadas em razão do alto custo, referente à baixa produtividade ou á difícil purificação (ALLEGRE & DERATANI, 1994; SZEJTLI, 1997; ALVE-PRADO et al., 2008).

Os principais campos de aplicação das CDs na indústria alimentícia estão relacionados com a encapsulação de aromas e sabor (melhorar as características organolépticas dos alimentos) e a extração de compostos, como o colesterol (ALVE-PRADO et al., 2008), mas outras aplicações em alimentos são realizadas, como a complexação de CDs com compostos fenólicos presentes em vegetais, frutas e bebidas, proporcionando a redução do escurecimento enzimático desses alimentos, os quais poderão ter uma maior vida de prateleira, visto que o escurecimento poderá alterar as propriedades organolépticas e a aparência dos produtos alimentícios (CARNEIRO et al., 2006).

Os compostos de sabor e aroma são, geralmente, formados por substâncias voláteis, que são facilmente degradadas quando não protegidas (SZEJTLI, 1982). Alguns aromas de frutas, principalmente as cítricas, são muito sensíveis a oxidação pelo ar e podem ser protegidos por ciclodextrinas (BHANDARI et al., 1988; PADUKKA et al., 2000).

Alguns dos objetivos da encapsulação de componentes de alimentos são: reduzir as interações do núcleo com fatores ambientais, retardando alterações que podem resultar em perda de aroma, alteração de cor ou perda do valor nutricional; separar componentes reativos ou incompatíveis; reduzir a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo (por exemplo, por evaporação, que é muito rápida no caso de compostos de sabor não encapsulados); evitar reações prematuras de um substrato; mascarar compostos de sabor indesejável; promover melhor solubilidade do núcleo e melhor incorporação em sistemas secos

(DEPYPERE et al., 2003). Outro importante objetivo é permitir que a liberação do material do núcleo ocorra lentamente com o tempo, ou a partir da ocorrência de um certo evento. Esse conceito é denominado de *liberação controlada*, podendo, portanto, referir-se ao controle do início da liberação ou da taxa de liberação. A liberação controlada ajuda a evitar a utilização inefetiva e a perda de compostos durante o processamento (AZEREDO, 2005).

Frequentemente, são utilizados óleos e gorduras para solubilizar os componentes de aromas, pelo fato de serem, em sua maioria, compostos apolares. Quando complexado com ciclodextrinas, os aromas passam a ficar uniformemente distribuídos nas misturas alimentares, não havendo a separação de fases oleosas e aquosas, e tornando desnecessário a adição extra de óleos ou gorduras para melhor dispersá-los no alimento. As complexações permitem a redução da volatilidade destes compostos, aumentando o tempo de estocagem e reduzindo perdas ALLEGRE & DERATANI, 1994; SZEJTLI, 1997; CARNEIRO et al., 2006).

De acordo com Santana e colaboradores (2005), a estabilização de compostos de aroma, em forma diluída a partir da encapsulação em ciclodextrina, pode ser utilizada para aromas, bioaromas e outros compostos voláteis susceptíveis à degradação pela ação da temperatura, do oxigênio, da luz e do tempo de estocagem, e à volatilização na forma livre. A encapsulação é feita de forma a diminuir as perdas durante a recuperação, o processamento e a estocagem destes compostos, devido à maioria dos compostos de aroma quando expostos ao oxigênio do ar, à luz e ao calor sofrerem oxidação, decomposição, tornarem-se resinosos, ou evaporarem. Quando esta forma de encapsulação é empregada na indústria de alimentos permite a solubilização de compostos oleosos em solução aquosa e a liberação dos compostos de aroma na boca, mantendo suas características sensoriais. Além disso, permite a obtenção de compostos de aroma em estado sólido. Os quais geralmente apresentam-se em estado líquido, o que também facilita seu armazenamento e amplia suas formas de aplicação (SANTANA et al., 2005).

Segundo Szente & Szejtli (1986), a inclusão molecular em  $\beta$ -CD foi efetiva em reduzir a perda de voláteis em café. A encapsulação de compostos de aroma com  $\beta$ -CD, também apresentou bons resultados na aromatização de chás e de bebidas instantâneas, como exemplo disto, temos o adiconamento do aroma de avelã em café utilizando as técnicas de encapsulamento com  $\beta$ -CD. Ao ser comparado o café com aroma de avelã pelo tradicional método de spray dry e o de

encapsulamento com ciclodextrinas, os provadores não conseguiram distinguir qual das técnicas foi utilizada para a aromatização, além de que, com o aumento da solubilidade e a redução da volatilidade do aroma, pela técnica de encapsulamento com  $\beta$ -CD, a quantidade de aroma de avelã utilizado foi a metade daquela utilizada pela técnica tradicional (ALLEGRE & DERATANI, 1994; SZEJTI, 1997).

Em alguns alimentos prontos, a  $\beta$ -CD foi usada para mascarar o gosto amargo de proteínas hidrolisadas ou de alho. Os produtos ABB (*ant body breath* - anti mau hálito) com pequenas quantidades de  $\beta$ -CD, são amplamente desenvolvidos no Japão na forma de tabletes ou gomas de mascar (ALLEGRE & DERATANI, 1994; SZEJTI, 1997).

Alguns trabalhos foram realizados envolvendo a encapsulação de corantes. As fortes restrições impostas pelo mercado ao uso de corantes sintéticos têm motivado sua

crescente substituição por pigmentos naturais. No entanto, além de mais caros que os sintéticos, os pigmentos naturais são muito instáveis quimicamente. Os carotenóides, por exemplo, que constituem uma das principais classes de corantes naturais, são muito suscetíveis a oxidação e isomerização, que resultam em perda de cor. A encapsulação, além de evitar essa degradação, possibilita ainda a dispersão dos carotenóides em água, facilitando sua aplicação em alimentos. Matioli & Rodriguez-Amaya (2003), encapsulando licopeno, observaram que, quanto maior a proporção de  $\gamma$ -CD, maior foi a intensidade de cor do produto final. A estabilidade do complexo foi excelente, mesmo em presença de luz. Em alguns trabalhos, os autores concluíram que a encapsulação aumenta a estabilidade de carotenóides, antocianinas e betalaínas (CAI & CORKE, 2000; GRADINARU et al., 2003; POLYAKOV et al., 2004).

## REFERÊNCIAS

ABELYAN, V. A.; GASPARYAN, A. V.; AVAKYAN, Z. G. e AFRIKYAN, É. G. Extracellular cyclodextrin glycosyltransferase from the thermophilic bacterium *Bacillus* sp. *Biochemistry - Moscow (Biokhimiya)*. v.56, n.9, p. 1108-1112 (1578-1582), 1991.

ABELYAN, V. A.; AVAKYAN, A. G.; MELKUMYAN, A. G.; BALAYAN, A. M.; UZUNYAN, L. V. e GASPARYAN, A. V. Comparison of cyclodextrin glycosyltransferases from various groups of microorganisms. *Biochemistry - Moscow (Biokhimiya)*. v.57, n.3, p. 285-291 (430-437), 1992.

ABELYAN, V. A.; YAMAMOTO, T. e AFRIKYAN, É. G. On the mechanism of action of cyclomaltodextrin glucotransferases of alkalophilic, thermophilic and mesophilic microorganisms. *Biochemistry - Moscow (Biokhimiya)*. v.59, n.8, p.839-844, 1994.

ABELYAN, V. A.; AFYAN, K. B.; AVAKYAN, Z. G.; MELKUMYAN, A. G. e AFRIKYAN, E. G. Cyclomaltodextrin glucotransferases from thermophilic actinomycetes. *Biochemistry - Moscow (Biokhimiya)* v.60, n.10, p. 1223-1229, 1995.

ABELYAN, V. A.; BALAYAN, A.M.;GHOCHIKYAN, V. T.; MARKOSYAN, A. A. Transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferases of various groups of microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology* .v. 40, n. 2, p. 129-134, 2004.

ALLEGRE, M. e DERATANI, A. Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality. *Agroo Food Industry Hi Technology*. January/February, p. 9-17, 1994.

ALVES-PRADO, H. F. Estudo da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus* sp alcalofílico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 144f., 2000.

ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E. AND DA SILVA, R. Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), microbiana e aplicação de ciclodextrinas em alimentos: Revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos*. v. 36, n. 1, p. 43-54, 2002a.

ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E. e DASILVA R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. *Brazilian Journal of Food Technology*. v. 5, n. 98, p.189-196, 2002b.

ALVES-PRADO, H. F.; CARNEIRO, A. A. J.; PAVEZZI, F. C.; GOMES, E.; BOSCOLO<sup>1</sup>, M.; FRANCO C. M. L. AND 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.

AMEMURA, A.; CHAKRABORTY, R.; FUJITA, M.; NOUMI, T. e FUTAI, M. Cloning and nucleotide sequence of the isoamylase gene from *Pseudomonas amyloclavata* SB-15. *Journal of Biological Chemistry*. v. 263, p 9271-9275.

APPARU, C.; DRIGUEZ, H.; WILLIAMSON, G.; SVENSSON, B. Chemoenzymatic synthesis of 6-omega-alpha-D-glucopyranosyl-6omega-thiomaltoooligosaccharides. Their binding to

*Aspergillus niger* glucoamylase G1 and its starchbinding domain. *Carbohydrate Research*, v. 277, n. 2, p. 313 – 320, 1995.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BHANDARI, R., D'ARCY, B. R., BICH, L. L. T. Lemon oil to  $\beta$ -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of  $\beta$ -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *J. Agric. Food Chem.* v.46, p. 1494-1499, 1998.

BENDER, H. Cyclodextrin-glucoamyltransferase von *Klebsiella pneumoniae*. I. Synthese, Reinigung und eigenschaften des enzymes von *K. pneumoniae* M5a1. *Archives of Microbiology*. v. 111, p. 271-281, 1977.

BENDER, H. Studies of the inhibition by maltooligosaccharides of the cyclisation reaction catalysed by the cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1 with glycogen. *Carbohydrate Research*. v. 135, p. 291-302, 1985.

BENDER, H. Production, Characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*. v.6, p. 31-71, 1986.

BERGAMASCO, R.C. Complexação de sulfuramida em ciclodextrinas. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, p.74, 2003.

BERGSMA, J.; BRUINENBERG, P.M.; HOKSE, H. cyclodextrins from potato starch: recent developments. In: HUBER, O.; SZEJTLI, J. (Eds.); Proceedings of the fourth international symposium on cyclodextrins: 41-46 Vol. 76; Kluwer Academic Publishers, Munich, West Germany (1988).

BERKECZ, R., TOROK, R., ILISZ, I., FORRO, E., FULOP, F. AND ARMSTRONG, D.W. LC Enantioseparation of aryl-substituted  $\beta$ -lactams using variable-temperature conditions *Chromatographia*. v. 63, p. S37-S43, 2006.

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

BERTOLDO, C. AND ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*. v. 6, p. 151-160, 2002.

- BOEL, E.; BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z.; DODSON, G. G.; JENSEN, V. J.; PETERSEN, S. B.; SWIFT, H.; THIM, L. e WOLDIKE, H. F. Calcium binding in alpha-amylases: an X-ray diffraction study at 2.1Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*. v. 29, p. 6244-6249, 1990.
- BOVETTO, L.J.; BACKER, D. P.; VILLETTE, J. R.; SICARD, P. JE BOUQUELET, S. J-L. Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. v.15, p. 48-58, 1992.
- BREWSTER, E.M AND LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.59: p. 645-666. 2007.
- BRUINENBERG, P.M., HULST, A.C., FABER, A., VOOGD, R.H. *A process for surface sizing or coating of paper*. Eur. patente application EP 0.690.170, 1996.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V. e BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 23, p. 85-112, 1998.
- CARNEIRO, A. A. J.; ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E. AND DA SILVA, R. Escurecimento enzimático em alimentos: ciclodextrinas como agente antiescurecimento. *Alimentos e Nutrição*, v.17, n.3, p.345-352, 2006.
- CAI, Y.Z. AND CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, v.65, n.7, p.1248-1252, 2000.
- CRAVOTTO, G., BINELLO, A., BARANELLI, E., CARRARO, P. AND TROTTA, F. Cyclodextrins as food additives and in food processing. *Current Nutrition & Food Science*. v. 2, n. 4, p. 343-350, 2006.
- CITERNESI, U., SCIACCHITANO, M. Ciclodextrinas em dermocosméticos funcionais. *Cosmetics & Toiletries*, v.7, p. 50-55, 1995
- CHUNG, H. J.; YOON, S. H.; LEE, M. J.; KIM, M. J.; KWEON, K. S.; LEE, I. W.; KIM, J. W.; OH, B. H.; LEE, H. S.; SPIRIDONOVA, V. A. e PARK, K. H. Characterization of a thermostable cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.46, p.952-959, 1998.
- DEL RIO, G.; MORETT, E.; SOBERON, X. Did cyclodextrin glycosyltransferase evolve from alpha-amylases? *FEBS Letters*, v. 416, n. 2, p. 221-224, 1997.

- DEPYPERE, F. DEWETTINCK, K., RONSSE, F. AND PIETERS, J. G. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. *Applied Biotechnology Food Science and Policy*, v.1, n.2, p.75-94, 2003.
- DOUKYU, N. KUWAHARA, H.; AONO, R. Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces cyclodextrin glucanotransferase resistant to organic solvents. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. v. 67, n. 2, p. 334-340, 2003.
- FERRAROTTI, S. A.; ROSSO, A. M.; MARÉCHAL, M. A.; KRYMKIEWICZ, N. e MARÉCHAL, L. R. Isolation of two strains (S-R type) of *Bacillus circulans* and purification of a cyclomaltodextrin-glucanotransferase. *Cellular and Molecular Biology*. v. 42, n.5, p. 653-657, 1996.
- FIEDLER, G.; PAJATSCH, M. e BOCK, A. Genetics of a novel starch utilization pathway present in *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Molecular Biology*. v 256, p 279-291, 1996.
- FLECK, M.C., YANG T., WADA Y. AND BACH T. Regioselective [2 + 2]-photocycloaddition reactions of chiral tetronates-influence of temperature, pressure, and reaction medium. *Chemical Communications*. v. 8, p. 822-824, 2007.
- FREITAS, T. L; MONTI, R. e CONTIERO, J. Production of CGTase by a *Bacillus alkalophilic* CGII strain isolated from wastewater of a manioc flour industry. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 35, p. 255-260, 2004.
- FRENCH, D. The Schardinger dextrans. *Advance in Carbohydrate Chemistry*. v.12, p.189-260, 1957.
- FREUDENBERG, K. e CRAMER, F. Uber Die Schardinger dextrine aus starke. *Chemische Berichte - Recuell*. v.83, p.296, 1950.
- FREUDENBERG, K.; CRAMER, F. and PLIENINGER, H. Patent 895, p.769, Germany, 1953.
- FUJITA, Y.; TSUBOUCHI, H.; INAGI, Y. TOMITA, K.; OZAKI, A. e NAKANISHI, K. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. AL-6. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. v.70, n.3, p. 150-154, 1990.
- FUNAYAMA, M.; ARAKAWA, H.; YAMAMOTO, R. Enzymatic synthesis of hydroquinoneglucoside. *Seibutsu Kogaku Kaishi*, v. 75, n. 3, p. 177180, 1997.

- FUNAYAMA, M.; NISHINO, T.; HIROTA, A.; MURAO, S.; TAKENISHI, S.; NAKANO, H. Enzymatic synthesis of (+) catechinalphaglucoiside and its effect on tyrosinase activity. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 57, n. 10, p 1666-1669, 1993.
- GAWANDE, B. N.; SINGH, R. K. CHAUHAN; GOEL, A. e PATKAR, A. Y. Optimization of cyclomaltodextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus*. *Enzyme and Microbial Technology*.; v. 22, n. 3, p.288-291, 1998.
- GAWANDE, B. N.; GOEL, A.; PATKAR, A. e NENE, S. N. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.51, p. 504-509, 1999.
- GAWANDE, B. N. e PATKAR, A. Y. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme and Microbial Technology*. v.28, n. 9-10, p. 735-743, 2001.
- GAWANDE, B.N., SONAWANE, A.M., JOGDAND, V.V., PATKAR, A.Y. Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22 in batch, fed-batch and continuous cultures. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 1697-1702, 2003.
- GRADINARU, G.; BILIADERIS, C. G.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. AND GARCIA-VIGUERA, C. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*, v.83, p.423-436, 2003.
- GUJRAL, H.S., GUARDIOLA, I., CARBONELL, J.V., ROSELL, C.M. Effect of cyclodextrinase on dough rheology and bread quality from rice flour. *Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.3814-3818, 2003 .
- HAKI, G. D. e RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. v. 89, p. 17-34, 2003.
- HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, T.; FUJIWARA, S.; TAKAGI, M. e IMANAKA, T. Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of cyclomaltodextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain B1001. *Journal of Bacteriology*. v. 183, n. 17, p. 5050-5057, 2001.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemistry Journal*. v.280, p. 309-316, 1991.

- HIGUTI, I.H.; GRANT, S.W.; SACCO, R. E NASCIMENTO, J. A. Isolation of alkalophilic CGTase-producing bacteria and characterization of cyclodextrin-glycosyltransferase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 46, p. 183-186, 2003.
- HOLLÓ, J. e HOSCHKE, A. Bioconversion of starch. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*. V. 2/43, n.1, p. 5-37, 1993.
- HORIKOSHI, K. Alkaliphiles – from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, v.18, p.259-270, 1996.
- HORVÁTHOVÁ, V.; JANECEK, S. e STURDÍK, E. Amilolytic enzymes: their specificities, origins and properties. *Biologia/Bratislava*. v. 55, n. 6, p. 605-615, 2000.
- IBRAHIM, H.M.; YUSOFF, W.M.W.; HAMID, A.A.; ILLIS, R.M; HASSAN, O. e OMAR, O. Optimization of medium for the production of  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase using central composite desing (CCD). *Process Biochemistry*. v. 40, p. 753-758, 2005.
- JAMUNA, R.; SASWATHI, N.; SHEELA, R. and RAMAKRISHMA, S. V. Synthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 43, p. 163-176, 1993.
- JANECEK, S. Tracing the evolutionary lineages among  $\alpha$ -amylase and cyclodextrin glycosyltransferases: the question of so-called “intermediary” enzymes. *Biologia (Bratislava)*. v. 50, p. 515-522, 1995
- JANECEK, S.; SVENSSON, B. e HENRISSAT, B. Domain evolution in the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Molecular Evolution*. v.45, p. 322-331, 1997.
- JANECEK, S.  $\alpha$ -amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Molecular Biology*. v. 67, p.67-97, 1997.
- JANECEK, S. Structural features and evolutionary relationship in the  $\alpha$ -amylase family. *Glycoenzymes*. p. 19-54, 2000.
- JANECEK, S. How many conserved sequence regions are there in the  $\alpha$ -amylase family? *Biologia, Bratislava*. v. 57, suppl. 11, pp 29-41, 2002.
- JANECEK, S.; SVENSSON, B. e MCGREGOR, A. Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the  $\alpha$ -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *European Journal of Biochemistry*. v.270, p. 635-645, 2003.

JESPERSEN, H. M.; MCGREGOR, E. A.; SIERKS, M. R. E SVENSSON, B. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochemistry Journal*. v. 280, p. 51-55, 1991.

JESUS, M.B., ALVES PINTO, L.M., DE PAULA, E. Caracterização do complexo sólido praziquantel em  $\beta$ -ciclodextrina. *Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP*, 2001.

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 7, p. 210-218, 2004.

JUN, H.-K.; BAE, K.-M. e KIM, S.-K. Production of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid using cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus* sp. *Biotechnology Letters*. v.23, p. 1793-1797, 2001.

KAMASAKA, H.; OKADA, S.; KUSAKA, K.; YAMAMOTO, K.; YOSHIKAWA, K. *Phosphorylated saccharide and method for producing the same*. US PATENT 5.861.048, Jan 1999

KATO, T. e HORIKOSHI, K. Gamma-cyclodextrin. A new gamma-cyclodextrin forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* n<sup>o</sup>313. *Journal of Japanese Society Starch Science* v.2, p.137, 1986.

KATSURAGI, N.; TAKIZAWA, N. e MUROOKA, Y. Entire nucleotide sequence of the pullulanase gene of *Klebsiella aerogenes* W70. *Journal of Bacteriology*. v. 169, p 2301-2306, 1987.

KHANNA, K.V., WHALEY, K.J., ZEITHIN, L., MOENCH, T.R., MEHRAZAR, K., CONE, R.A., LIAO, Z., HILDRETH J.E.K., HOEN, T.E., SHULTZ, L., MARKHAM, R.B. Vaginal transmission of cell-associated HIV-1 in the mouse is blocked by a topical, membrane-modifying agent. *Journal of Clinical Investigation*, v.109 (2), p. 205-211, 2002.

KIM, J. R. AND YOON, C. Optimization of transglucosylation reaction of stevioside. *Korean Journal of Food Science and Technology*, v. 29, n. 2, p. 249-254, 1997.

KIM, T. K.; PARK, D. C.; LEE, Y. K. Synthesis of glucosylsugar alcohols using glycosyltransferases and structural identification of glucosylmaltitol. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 7, n. 5, p. 310317, 1997..

KITAHATA, S.; TSUYAMA, N. and OKADA, S. Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agricultural and Biological Chemistry*. v.38, n.2, p. 387-393, 1974.

- KITAHATA, S. And OKADA, S. Action of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus megaterium* strains n°5 on starch. *Agricultural and Biological Chemistry*. v.38, p.2413, 1974.
- KOBAYASHI, S.; KAINUMA, K. e SUZUKI, S. Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase *Carbohydrate Research*. v.61, p.229-238, 1978.
- KOMETANI, T.; TERADA, Y.; NISHIMURA, T.; TAKII, H. e OKADA, S. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and transglycosylation at alkaline pHs. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. v.58, n.3, p.517-520, 1994.
- KOMETANI, T.; TERADA, Y.; NISHIMURA, T.; NAKAE, T.; TAKII, H.; OKADA, S. Acceptor specificity of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and synthesis of glucosyl rhamnose. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 60, n. 7, p. 1176 -1178, 1996.
- KRAGH, K. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B. W. *Enzyme*. US App Patent 20060134266, Jun 2006.
- KURIKI, T. and IMANAKA, T. The concept of the  $\alpha$ -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v.87, n.10, p. 557-565, 1999.
- KURIMOTO, M.; TABUCHI, A.; MANDAI, T.; SHIBUYA, T.; CHAEN, H.; FUKUDA, S.; SUGIMOTO, T.; TSUJISAKA, Y. Synthesis of glycosyltrehaloses by cyclomaltodextrin glucanotransferase through the transglycosylation reaction. *Bioscience, Biotechnonology and Biochemistry*, v. 61, n. 7, p. 1146 -1149, 1997.
- LARSEN, K. L.; ENDO, T.; UEDA, H.; ZIMMERMANN, W. Inclusion complex formation constants of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ - and  $\theta$ -cyclodextrins determined with capillary zone electrophoresis. *Carbohydrate Research*. v.309, p.153-159, 1998a.
- LARSEN, K. L.; CHRISTENSEN, H. J. S.; MATHIENSEN, F. PEDERSEN, L. H.; ZIMMERMANN, W. Production of cyclomaltononaose ( $\delta$ -cyclodextrin) by cyclodextrin glycosyltransferases from *Bacillus* spp. and bacterial isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.50, p.314-317, 1998b.

- LARSEN, K.L.; DUEDHAL-OLISEN, L.; CHRISTENSEN, H.J.S.; MATHIESEN, F.; PEDERSEN, L.H. ; ZIMMERMANN, W. Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. F8. *Carbohydrate Research*. v.310, p.211-219, 1998c.
- LARSEN, K. L. AND ZIMMERMANN, W. Analysis and characterization of cyclodextrins and their inclusion complexes by affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v.836, p.3-14, 1999.
- LÁSZLÓ, E.; BANKY, B. e SERES, G. Purification of cyclodextrin glycosyl transferase enzyme by affinity chromatography. *Starch/Stärke*. v.33, p. 281-283, 1981.
- LEE, J. H.; CHOI, K. H.; LEE, Y. S.; KWON, I.B. e YU, J. H. Enzymatic production of  $\alpha$ -cyclodextrin with the cyclomaltodextrin glucoamylase of *Klebsiella oxytoca* 19-1. *Enzyme and Microbial Technology*. v.14, n.12, p. 1017-1020, 1992.
- LEE, S.H.; KIM, Y.W.; LEE, S.; AUH, J.H., YOO, S.S., KIM, T.J., KIM, J.W., KIM, S.T., RHO, H.J., CHOI, J.H., KIM, Y.B., PARK, K.H. Modulation of cyclizing activity and thermostability of cyclodextrin glucoamylase and its application as an antistaling enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.1411-1415, 2002
- LEEMHUIS, H.; DIJKSTRA, D.W. e DIJKHUIZEN, L. Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes cyclodextrin glycosyltransferase: mechanism and kinetics of inhibition by acarbose and cyclodextrins. *European Journal of Biochemistry*. v. 270, p. 155-162, 2003.
- LY, H.D. e WITHERS, S.G. Mutagenesis in glucosidases. *Annual Review of Biochemistry*. v. 68, p. 487-522, 1999.
- MACGREGOR, E.A.; JANECEK, S. e SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1546, p. 1-20, 2001.
- MALDONADO, H.G. e LÓPEZ, O.P. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Critical Reviews in Food Science and nutrition*. v. 35, n.5, p. 373-403, 1995.
- MARÉCHAL, L.R.; ROSSO, A.M.; MARÉCHAL, M.A.; KRYMKIEWICZ, N. e FERRAROTTI, S.A. Some properties of a cyclomaltodextrin glucoamylase from *Bacillus circulans* DF 9 R type. *Cellular and Molecular Biology*. v.42, n.5, p. 659-664, 1996.

MARTIN, M. T.; CRUCES, M. A.; ALCALDE, M.; PLOU, F. J.; BERNABE, M.; BALLESTEROS, A.; Synthesis of maltooligosyl fructofuranosides catalyzed by immobilized cyclodextrin glucosyltransferase using starch as donor. *Tetrahedron*, v. 60, n. 3, p 529-534, 2004

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

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

MARTINS, R. F. AND HATTI-KAUL, R. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase: activity and stability features. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 819-827, 2003.

MARTINS, R. An alkaline active cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. Doctoral thesis. Lund University, Lund, Sweden, 2003.

MATIOLI, G.; ZANIN, G.M.; 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. *Ciclodextrinas e suas aplicações em : alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais*. Maringá, PR, Editora Eduem, 124p, 2000.

MATIOLI, G.; ZANIN, G.M.; GUIMARÃES, M.F.; MORAES, F.F. Enhancement of selectivity for producing  $\gamma$ -cyclodextrin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.84-86, p.955-962, 2000.

MATIOLI, G. AND RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*., v.23, p.102-105, 2003.

MATSUURA, Y.; KUSUNOKI, M. e HARTADA, W. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *Journal of Biochemistry*. v. 95, p 697-702, 1984

MAURER, K-H.; BREVES, R.; POLANYI, L.; SCHMIDT, I.; WEBER, A.; HELLEBRANDT, A.; KOTTWITZ, B. *Novel cyclodextrin glucanotransferase (CGTase), obtained from Bacillus agaradherens / I (DSM 9945) and detergents and cleaning agents containing said novel cyclodextrin glucanotransferase*. Eur. patente application EP 1.337.648, 2003.

- MCCLENAHAN, W.S.; TILDEN, E.B. e HUDSON, C.S. A study of the products obtained from starch by the action of the amylase of *Bacillus maceran*. *Journal of the American Chemical Society*. v.64, p.2139-2144, 1942.
- MORI, S.; HIROSE, S.; OYA, T. e KITAHATA, S. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. v.58, n. 11, p. 1968-1972, 1994.
- NAIR, R.K. AND SAWANT, M.R. Study of solubility of inclusion complex of permethrin with  $\beta$ - cyclodextrin. *Pestology*. v.29, n. 8, p. 38-43, 2005.
- NAKAMURA, N. e HORIKOSHI, K. Purification e properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*. v.40, n.5, p. 935-941, 1976a.
- NAKAMURA, N. e HORIKOSHI, K. Purification and properties of neutral-cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*. v. 40, n. 9, p. 1785-1791, 1976b.
- NIGAM, P. e SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and microbial Technology*. v.17, p. 770-778, 1995.
- NILSEN, J.E. e BORCHET, T.V. Protein engeneering of bacterial  $\alpha$ -amylase. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1543, p. 253-274, 2000.
- NITSCHKE, L.; HEEGER, K.; BENDER, H. AND SCHULZ, G. E. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* oh the  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Bacillus circulans* strain n°8. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.33, p.542-546, 1990.
- NORBERG, E. e FRENCH, D. Studies on the Schardinger dextrans. III. Redistribution reactions of macerans amylase. *Journal of the American Chemical Society*. v.72, p.1202-1205, 1950.
- NSKC - NIHON SHOKUHIN KAKO CO.,LTD. Celdex (cyclodextrins). 2ª edição, abril 1983. Tokyo-Japão.
- PADUKKA, I.; BHANDARI, B. AND D'ARCY B. Evaluation of various extraction methods of encapsulated oil from  $\beta$ -cyclodextrin-lemon oil complex powder. *Journal Of Food Composition And Analysis* v. 13, p. 59-70, 2000.

- PAJATSCH, M.; GERHAT, M.; PEIST, R.; HORLACHER, R.; BOOS, W. e BOCK, A. The periplasmatic cyclodextrin binding protein CymE from *Klebsiella oxytoca* and its role in maltodextrin and cyclodextrin transport. *Journal of Bacteriology*. v. 180, p. 2630-2635, 1998.
- PALACIO, A., GARAU, M., CUÉTARA, M.S. Tratamiento actual de las dermatofitosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 19, p.68-71, 2002.
- PARK, K., KIM, T., CHEONG, T., KIM, J., OH, B., SVENSSON, B. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the  $\alpha$ -amylase family. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1478, p.165-185, 2000.
- PLOU, F. J.; MARTIN, M. T.; SEGURA, A. G.; ALCALDE, M.; BALLESTEROS, A.; Glucosyltransferase acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 80, n. 6, p. 743-752, 2002
- POLYAKOV, N.E.; LESHINA, T.V.; KONOVALOVA, T. A.; HAND, E. O. AND KISPERT, L. D. Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: <sup>1</sup>HNMR, EPR, and optical studies. *Free Radical Biology and Medicine*. v.36, n.7, p.872-880, 2004.
- PÓSCI, I.; NÓGRÁDY, N.; LIPTÁK, A. E SZENTIRMAI, A. Cyclodextrins are likely to induce cyclodextrin glycosyltransferase production in *Bacillus macerans*. *Folia Microbiologica*. v. 43, n. 1, p. 71-74, 1998.
- PSZCZOLA, D.E. Production and potential food applications of cyclodextrins. *Food Technology*. January, p.96-100, 1988.
- QIAN, M.X.; HASER, R.; BUSSION, G.; DUEE, E. e PAYAN, F. The active center of a mammalian  $\alpha$ -amylase. Structure of the complex of a pancreatic  $\alpha$ -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2 Å resolution. *Biochemistry*. v. 33, p. 6284-6294, 1994.
- RAMAKRISHNA, S. V.; SASWATHI, N.; SHEELA, R. e JAMUNA, R. Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus*. *Enzyme and Microbial Technology*. v.16, n.5, p. 441-444, 1994.
- REGIERT, M. Stabilizing linoleic acid by complexation with  $\alpha$ -cyclodextrin. *Cosmetics & Toiletries*. v. 121, p. 43- 50, 2006.
- ROBYT, J. F. *Essentials of carbohydrate chemistry*. New York. Springer, 1998. Cap. 8, p. 245-250.

- RODENBURG, K.W.; JUGE, N.; GUO, X.-J.; SOEGAARD, M.; CHAIX, J.C. e SVENSSON, B. Domain B protruding at the third  $\beta$ -strand of the  $\alpha/\beta$  barrel in barley  $\alpha$ -amylase confers distinct isoenzyme-specific properties. *European Journal of Biochemistry*. v. 221, p. 277-284, 1994.
- SÁ BARRETO L.C.L. AND CUNHA-FILHO M.S.S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. *Latin American Journal of Pharmacy*. v. 27, n. 4, p. 629-636 2008.
- SABIONI, J.G. AND PARK, Y.K. Production and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. *Starch/Stärke*. v. 44, n. 6, p. 225-229, 1992a.
- SABIONI, J.G. e PARK, Y.K. Cyclodextrin glycosyltransferase production by *Bacillus lentus*. *Revista de Microbiologia*. v. 23, n. 2, p. 128-132, 1992b.
- SALVA, T.J.G.; LIMA, V.B. e PAGAN, A.P. Screening of alkalophilic bacteria for cyclodextrin glycosyltransferase production. *Revista de Microbiologia*. v. 28, p. 157-164, 1997.
- SANTANA, M. H. A.; MARTINS, F. AND PASTORE, G. M; Processos de estabilização de bioaromas por encapsulação em ciclodextrinas e em lipossomas. *PI0403279-9*, 2005.
- SHIBUYA, T.; MIWA, Y.; NAKANO, M.; YAMAUCHI, T.; CHAEN, H.; KAKAI, S. e KURIMOTO, M. Enzymatic synthesis of a novel trisaccharide, glucosyl lactoside. *Biociences Biotechnology and Biochemistry*. v. 57, p. 56-60, 1993.
- SHIBUYA, T., AGA, H., WATANABE, H., SONODA, T., KUBOTO, M., FUKUDA, S., KURIMOTO, M., TSUJISAKA, Y. Transglycosylation of glycosyl residues to cyclic tetrasaccharide by *Bacillus stearothermophilus* cyclomaltodextrin glucoamylase using cyclomaltodextrin as the glycosyl donor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.67, n.5, p.1094-1100, 2003.
- SHUKLA, T.P. Industrial Research on cyclodextrins. *Cereal Foods World*. v.36, n.4, p.387, 1991.
- SIAN, H.K.; SAID, M.; HASSAN, O.; KAMARUDDIN, K.; ISMAIL, A.F.; RAHMAN, R.A.; MAHMOOD, N.A.N. e ILLIAS, R.M. Purification and characterization of cyclodextrin glucoamylase from alkalophilic *Bacillus* sp G1. *Process Biochemistry*. v. 40, n. 1-2, p. 1101-1111, 2005.

- SINGH, M.; SHARMA, R. e BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*. v. 20, p. 341-359, 2002.
- SMETS, J.; PINTENS, A. *Detergent compositions comprising a cyclodextrin glucanotransferase enzyme*. WO 0202725, 2002.
- STARNES, R.L. Industrial potencial of cyclodextrin glycosyltransferases. *Cereal Foods World*. v.35, n.11, p. 1094-1099, 1990.
- STARNES, R. *Thermostable cyclodextrin glycosyl transferase and precesses using it*. US Patent 6.184.001, Fev. 2001.
- STROKOPYTOV, B.; PENNINGA, D.; ROZEBOOM, H.J.; KALK, K.H.; DIJKHUIZEN, L. e DIJKSTRA, B.W. X-ray structure of cyclodextrin glkycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. *Biochemistry*. v. 34, p. 2234-2240, 1995.
- SVENSSON, B. Protein engineering in the  $\alpha$ -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Molecular Biology*. v. 25, p. 141-157, 1994.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrin in food, cosmetic and toiletries. *Starch/Stärke*. v. 34, n. 11, p. 379-385, 1982.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrin in Pesticides. *Starch/Stärke*. v. 37, n. 11, p. 382-386, 1985.
- SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *Journal of Material Chemistry*. v. 7, n. 4, p. 575-587, 1997.
- SZEJTLI, J. Introduction and general overview and cyclodextrin chemistry (Review). *Chemical Review*. v. 98, n. 5, p. 1743-1754, 1998.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrin in the textile industry. *Starch/Stärke*. v. 55, p. 191-196, 2003.
- SZENTE, L. AND SZEJTLI, J. Molecular encapsulation of natural and synthetic coffee flavor with -cyclodextrin. *Journal of Food Scienc*, v.51, p.1024-1027, 1986
- SZENTE, L. e SZEJTLI, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 36, p. 17-28, 1999.
- TACHIBANA, Y.; KURAMURA, A.; SHIRASAKA, N.; SUZUKI, Y.; YAMAMOTO, T.; FUJIWARA, S.; TAKAGI, M. e IMANAKA, T. Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomaltodextrin glucanotransferase from a newly isolated

hyperthermophilic archaeon, a *Thermococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 5, p. 1991-1997, 1999.

TAKADA, M.; NAKAGAWA, Y. e YAMAMOTO, M. Biochemical and genetic analyses of a novel  $\gamma$ -cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus clarkii* 7374. *Journal of Biochemistry*. v. 133, n. 3, p. 317-324, 2003.

TERAO, K. K.; NAKATA, M. D. AND UEKAWA, Y. Long known but brand new useable tool for food science - new use of natural cyclodextrins. *Foods and Food Ingredients Journal Of Japan*, v. 210; p. 222-243, 2005

TESTER, R.F.; KARKALLAS, J. e QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. v. 39, p. 151-165, 2004.

THIEMANN, V.; DONGES, C.; PROWE, S.G.; STERNER, R. e ANTRANIKIAN, G. Characterisation of a thermoalkali-stable cyclodextrin glycosyltransferase from the anaerobic thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii* *Archives of Microbiology*. v. 182, n. 2-3, p. 226-235, 2004.

THOMAS, D.J. AND ATWELL, W.A. Starch Structure. In: *Starches: practical guides for the food industry*. St. Paul, Minnesota, Eagan Press, 1999. Cap. 1, p. 1-11.

TILDEN, E.B. and HUDSON, C.S. Preparation and properties of amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa*. *Journal of Bacteriology*. v. 43, p. 527-544, 1942.

TOMITA, K.; KANEDA, M.; KAWAMURA, K. e NAKANISHI, K. Purification and properties of a Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. v. 75, n. 2, p. 89-92, 1993.

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

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

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

- VAN DER VEEN, B.A.; UITDEHAAG, J.C.M.; DIJKSTRA, B.W. e DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1543, p. 336-360, 2000a.
- VAN DER VEEN, B.A.; UITDEHAAG, J.C.M.; PENNINGA, D.; VAN ALEBEEK, G.-J.W.M.; SMITH, L.M.; DIJKSTRA, B.W. e DIJKHUIZEN, L. Rotacional design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase  $\alpha$ -cyclodextrin production. *Journal of Molecular Biology*. v. 296, p. 1027-1038, 2000b.
- VAN DER VEEN, B.A.; VAN ALEBEEK, G.-J.W.M.; UITDEHAAG, J.C.M.; DIJKSTRA, B.W. e DIJKHUIZEN, L. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. *European Journal of Biochemistry*. v. 267, n. 3, p. 658-665, 2000c.
- VAN EIJK, J.H. AND MUTSAERS, J.H.G. *Process for increasing the volume of baked product*. Patente application US5916607, 1999.
- VIHINEN, M. and MÄNTSÄLÄ, P. Microbial amylolytic enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. v. 24, n. 4, p. 329-418, 1989.
- VRETBLAD, P. Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. The cyclohexaamylose- $\beta$ -amylase system. *FEBS Letters*. v. 47, p. 86-89, 1974.
- WIND, R.D.; LIBL, W.; BUITELAAR, R.M.; PENNINGA, D.; SPREINAT, A.; DIJKHUIZEN, L. e BAHL, H. Cyclodextrin formation by the thermostable  $\alpha$ -amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 61, n. 4, p. 1257-1265, 1995.
- WIND, R. D.; UITDEHAAG, J. C. M.; BUITELAAR, R. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 10, p.5771-5779, 1988.
- YAGI, Y.; KOUNO, K. AND INUI, T. US Patent 4 317 881, 1980
- YIM, D.G.; SATO, H.H.; PARK, Y.H. e PARK, Y.K. Production of cyclodextrin from starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v. 18, p. 402-405, 1997.

YU, E. K. C.; AOKI, H. e MISAWA, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied Microbiology and Biotechnology* v. 28, p. 377-379, 1988.

ZAMOST, B. L.; NIELSEN, H. K. e STARNES, R. L. Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*. v. 8, p. 71-82, 1991.

ZHEKOVA B., DOBREV, G., STANCHEV, V., PISHTIYSKI I. Approaches for yield increase of  $\beta$ -cyclodextrin formed by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v25, n 46, p. 1043-1049, 2009.

## **CAPÍTULO II**

**EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE AMIDO NA PRODUÇÃO DE  
 $\beta$ -CICLODEXTRINAS PELA CGTase DO *BACILLUS CLAUSII* E16**

**EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE AMIDO NA PRODUÇÃO DE  
β-CICLODEXTRINAS PELA CGTase DO *BACILLUS CLAUSII* E16**

**EFFECT OF STARCHES FROM DIFFERENT SOURCES IN THE PRODUCTION  
OF β-CYCLODEXTRINS BY CGTase FROM *BACILLUS CLAUSII* E16**

**Gisele Rodrigues Cucolo<sup>1</sup>, Maurício Boscolo<sup>2</sup> e Roberto da Silva\*<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE / UNESP

<sup>2</sup>Laboratório de Físico - Química – IBILCE / UNESP

\*e-mail: [dasilva@ibilce.unesp.br](mailto:dasilva@ibilce.unesp.br)

**RESUMO**

Ciclodextrina-glicosil-transferase é uma enzima capaz de formar moléculas de ciclodextrinas (CDs), a partir do amido. CDs são moléculas cíclicas formadas por monômeros de glicoses, unidos por ligações α-1,4. Os tipos mais comuns são α-, β- e γ- CD, de 6, 7 e 8 monômeros de glicose, respectivamente. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da concentração do amido e da utilização de fontes alternativas de amido como substrato na produção de CDs pela CGTase do *Bacillus clausii* subgrupo E16. Observou-se que a enzima produziu preferencialmente β-CD nos diferentes tipos de substrato utilizados (amido solúvel de batata PA, de milho, de trigo e de mandioca). O mais alto grau de conversão de CDs foi obtido com o uso de amido de mandioca, tendo convertido 95,3% (p/p) em β-CD, seguido de 86,6% (p/p) do amido solúvel. No estudo de concentração de substrato, 1% de amido de mandioca apresentou o melhor rendimento na produção de CDs.

**Palavras-chaves:** CGTase, ciclodextrina, amido de mandioca, *Bacillus clausii*.

**SUMMARY**

Cyclodextrin glycosyltransferase is an enzyme capable of converting starch into cyclodextrin (CD) molecule. CDs are cyclic oligosaccharides compounded of glucose units jointed by α-1,4 linkages. The most common types of cyclodextrins, α-, β- and γ- CD, consist of 6, 7 and 8 glucose units, respectively. The aim of this work was to verify the effect of different starch sources and the concentration of starch in the production of cyclodextrins by CGTase enzyme from *Bacillus clausii* E16. It was noticed that the enzyme mainly produced β-CD with the different types of starch (soluble potato starch, corn starch, wheat starch and cassava starch) used substrate.

The higher degree of conversion of CDs was obtained with the use cassava starch, of which 95,3% (w/w) was converted in  $\beta$ -CD, followed by 86,6% (w/w) of soluble starch. In the study of substrate concentration, 1% of cassava starch showed the best efficiency in the production of CDs.

**Key words:** CGTase, cyclodextrin, cassava starch, *Bacillus clausii*.

## INTRODUÇÃO

Depois da celulose, o amido é o principal carboidrato fotossintetizado pelas plantas. É encontrado principalmente em sementes, raízes e tubérculos (ROBYT, 1998; VAN DER VEEN et al., 2000). O amido é formado basicamente por dois polímeros distintos: amilose e amilopectina. A amilose é essencialmente um polímero linear, constituído de unidades de glicose ( $\alpha$ -D-glicopiranosil) unidas entre si por ligações  $\alpha$ -1,4. A amilopectina é um polímero altamente ramificado, formado por cadeias de amiloses, interligadas por aproximadamente 5% de ligações  $\alpha$ -1,6, formando uma estrutura altamente ramificada (HAMILTON et al., 2000).

Entre as enzimas que atuam no amido, a ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase; EC 2.4.1.19), vem ganhando grande importância industrial, por formar ciclodextrinas (CDs) como produto final. CDs são moléculas cíclicas formadas por unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas. As CDs mais conhecidas são do tipo  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD, consistindo de seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (BENDER, 1986; PSZCZOLA, 1988; YU et al, 1988).

Ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão cristalinos com uma variedade de compostos químicos orgânicos e inorgânicos, pela incorporação desses no interior da cavidade hidrofóbica dessas moléculas. Esse fenômeno, denominado como inclusão molecular, pode melhorar as propriedades físico-químicas da molécula encapsulada. Os efeitos benéficos proporcionados pelo uso de CDs incluem: proteger princípios ativos contra a oxidação pela luz, calor e volatilidade; mascarar, reduzir ou eliminar odores e sabores indesejáveis; estabilizar cores, tintas, aromas, vitaminas, temperos ou emulsões; aumentar a solubilidade de fármacos e substâncias químicas e transformar em pó alguns gases e líquidos (YU et al., 1988).

Conseqüentemente, devido à estabilidade dos complexos cristalinos originados, o interesse pela exploração comercial das CDs vem aumentando em vários setores industriais, incluindo os farmacêuticos, alimentícios, agroquímicos, químicos, entre outros (SZEJTLI, 1982; SZEJTLI, 1985; ALLEGRE & DERATANI, 1994; SZEJTLI, 1997; ALVES PRADO, 2000; SINGH et al., 2002). Atualmente, as indústrias de alimentos e de cosméticos utilizam 84% da produção mundial de CDs (ALVES PRADO et al, 2002).

O interesse em novas técnicas para a produção de CDs ou o aperfeiçoamento das já existentes, visando o aumento da produção, ganharam grande importância uma vez que há atualmente uma comercialização crescente de produtos empregando CDs no mercado mundial. Com isso, a melhora na produção de CDs têm sido o objetivo de muitos pesquisadores em todo o mundo. Estudos que enfocam microrganismos com boa atividade de CGTase, os quais visam à diminuição dos custos de produção e o aumento da disponibilidade das CDs e/ou trabalhos sobre otimização de atividade de CGTase e as condições de reação e métodos de recuperação de CDs e purificação de CGTases, é de interesse para o setor industrial e têm sido freqüentes. Como exemplos, temos o trabalho de Rendleman Jr. (1997) que obteve melhora significativa no rendimento de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD utilizando a CGTase de *Bacillus macerans* associada a complexantes específicos e a enzimas desramificantes. Cucolo (2006) estudou a otimização da produção da CGTase do *Bacillus clausii* subgrupo E16 em meio contendo polvilho doce em substituição ao amido solúvel, obtendo melhora considerável na produção da enzima. Matioli et al (2000) estudou a produção de  $\gamma$ -CD pela CGTase de *Bacillus firmus*, observando um aumento considerável na produção deste tipo de CD na presença do complexante glicerizina. Entretanto, são poucos os artigos que enfocam a minimização dos custos através do estudo do substrato.

Diversas fontes de amido são conhecidas, mas poucas são utilizadas na produção de ciclodextrinas. De acordo com Raja et al. (1990), o amido de batata e o amido de milho são os substratos mais empregados na produção de CDs, mas outros amidos como o de arroz, mandioca e trigo tem alto potencial e podem ser utilizados na produção de ciclodextrinas.

No Brasil temos uma alta produção de fécula de mandioca. Em 2007 esta produção foi estimada em 545 mil toneladas (ABAM, 2008), sendo esta fonte de amido, portanto, de fácil acesso para produção de CDs em nosso país.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o estudo da produção de ciclodextrinas pela CGTase do *Bacillus clausii* subgrupo E16, tanto em relação ao efeito da concentração do amido na produção das CDs, como em relação ao efeito da utilização de fontes alternativas de amido como substrato.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Reagentes**

Padrões de ciclodextrinas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD) foram adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Amido solúvel de batata PA foi obtido de Mallinckrodt (Paris, França), amido de mandioca e de milho foram obtidos da Cargil (São Paulo, Brasil) e amido de trigo foi extraído no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (IBILCE-UNESP, SP, Brasil). Extrato de levedura foi adquirido da Difco (Detroit, USA) e a peptona foi obtida da Biobrás (Minas Gerais, Brasil). Outros reagentes químicos analíticos foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany).

### **Microrganismo e condições de produção da CGTase**

A CGTase usada neste estudo foi obtida do *Bacillus clausii* E16 que é parte da coleção de microrganismos do LBMA-UNESP (ALVES PRADO, 2000). O microrganismo foi cultivado em fermentação líquida, em erlenmeyer de 250mL que continha 40mL de meio nutriente alcalino otimizado composto por 13,4g/L de amido solúvel, 4,9g/L de peptona, 5,9g/L de extrato de levedura, 1,0g/L de  $K_2HPO_4$ , 0,2g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 12,5g/L de  $Na_2CO_3$  (esterilizado separadamente), pH 10,1 (ALVES PRADO, 2000), mantidos sob agitação de 200rpm, a 35°C. Após 48h, o material bacteriano foi centrifugado a 10000xg, por 15 minutos, sob refrigeração de 5°C e o sobrenadante, livre das células, foi usado como CGTase bruta.

### **Purificação parcial da CGTase**

Com a intenção de utilização da enzima em alimentos, esta foi parcialmente purificada. O sobrenadante contendo a enzima bruta foi concentrada pelo sistema de ultrafiltração Pellicon<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, USA), de 10kDa com 50cm<sup>2</sup> de área. A CGTase concentrada foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel Sephadex superfina G-50 (coluna 2,6cm diâmetro x 100cm altura) pré-equilibrada com 20mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5), contendo 20mM NaCl. A eluição foi

realizada no mesmo tampão anterior com fluxo de 0,3mL/min, e frações de 4mL foram coletadas usando o coletor de frações (Pharmacia Biotech Frac-100, Sweden). As frações que continham atividade CGTase foram concentradas pelo Centriprep<sup>®</sup> YM-10 (Amicon Bioseparations, Millipore, Bedford, MA, USA) de 10kDa.

### **Análises da atividade CGTase**

A atividade CGTase foi analisada pelos métodos:

**1- Dextrinizante** descrito por Fuwa (1954) e Pongsawasdi & Yagisawa (1987) com algumas modificações. A reação foi composta por 0,1mL da solução enzimática, convenientemente diluída, adicionado a 0,3mL de solução de amido solúvel PA a 0,5%, em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,6. Após incubação a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0mL de solução de HCl 0,2M. Em seguida, a reação recebeu 0,5mL de reativo de iodo (0,30% de KI e 0,03% de I<sub>2</sub>). A mistura de reação foi diluída com 10mL de água destilada. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente de enzima inativa. A absorbância determinada a 700nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo iodo-amido por minuto.

**2- CD - fenolftaleína** baseado no método proposto por Makela et al (1988), onde 0,1mL de solução enzimática diluída foi adicionada 0,8mL de solução de amido solúvel PA a 1,0%, em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,6. Após incubação a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 4,0mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,25M. Em seguida, acrescentou-se 0,1mL de solução de fenolftaleína a 1mM. O controle recebeu a solução enzimática apenas no momento da leitura. A absorbância determinada em 550nm. Uma unidade de atividade enzimática pelo método CD-fenolftaleína foi definida como a quantidade de enzima, necessária para produzir 1µmol de β-ciclodextrina, por minuto e por mL de solução enzimática.

### **Determinação do açúcar redutor e de proteína**

A quantidade de açúcar redutor formado pela enzima foi analisada de acordo com o método de DNS padrão descrito por Miller (1959). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al (1951), usando soro albumina bovina como padrão.

### **Efeito do tipo de amido e da concentração de substrato na produção de CDs**

O estudo do efeito da concentração e do tipo de substrato na produção de CDs foi realizado com os amidos: solúvel de batata PA, de milho, de trigo e de mandioca. Os tipos de amidos testados foram analisados em duas concentrações, 1,0% e 2,5% (p/v), que foram suspensos em tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,5. As soluções foram autoclavadas a 120°C, por 10 min., a 1atm. Em seguida foi adicionado 1mL de CGTase (4U/mL) para cada 100mL de solução. A reação foi misturada e incubada em banho-maria com agitação de 100rpm a 55°C por 24h. Os resultados do experimento foram analisados estatisticamente através da análise de Variância e do teste de Tukey, para verificar o nível dos efeitos dos fatores e de suas interações, e estabelecer assim, a melhor concentração de substrato e tipo de amido para produção de CDs. A análise de variância permite que vários grupos sejam comparados a um só tempo, sendo uma análise simples e geral, que investiga a hipótese de que as médias de várias amostras são iguais, já com o teste de Tukey comparamos as médias e definimos o melhor tratamento. O programa utilizado foi o ESTAT – Sistema Para Análises Estatísticas - V.2.0 – UNESP (BANZATTO & KRONKA, 2002).

### **Quantificação das CDs produzidas**

O tipo de CD formada foi avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As condições da CLAE foram baseadas no descrito por Sato (1995). O sistema de CLAE consistiu da bomba Jasco PU 990 (Jasco Corporation, Japão) conectada a um detector de índice de refração Shodex RI 72. No sistema, foi conectado a coluna Zorbax Carbohydrates (250mm x 4,6mm, 5 $\mu$ , Aligent Technologies) instalada no forno em coluna Dionex STH 585 (Dionex Softron GmbH, Germany) a 35°C usando uma mistura de acetonitrila/água (65:35; v/v), corrida isocrática com um fluxo de 1,0mL/min.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Efeito da concentração dos substratos na produção de CDs em diversas fontes de amidos**

Diferentes tipos de amidos podem ser usados como substrato, mas o amido de batata é o mais comumente usado na produção de ciclodextrinas. Amido de milho

e trigo também são utilizados mas contém um alto percentual de amilose em relação a amilopectina, o que ocasiona menor produção de ciclodextrinas (RAJA et al., 1990; SZERMAN et al., 2007), quando comparado ao amido de batata.

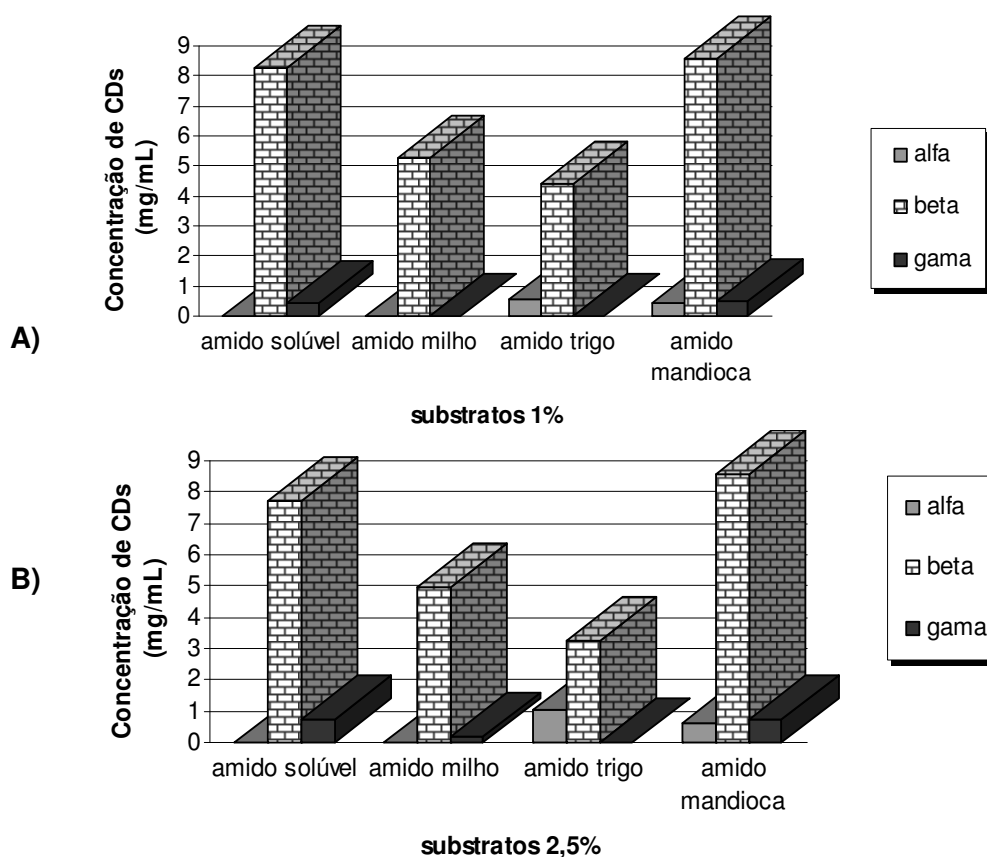
Com o intuito de melhor conhecer a produção de CDs pela CGTase do *Bacillus clausii* E16, primeiramente foram realizados estudos com relação a dois fatores fundamentais para minimização dos custos de produção de CDs: o tipo de substrato e sua concentração. Os dados encontrados pela análise por CLAE (Tabela 1) apontaram que a CGTase do *Bacillus clausii* E16, independente da origem do amido produziu preferencialmente  $\beta$ -CDs. O mais alto grau de conversão de CDs foi obtido com o uso de amido de mandioca 1% (95,30%), sendo a proporção de  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$  encontrada 0,05:1,0:0,06 respectivamente. Vários estudos ao longo dos anos apontam que CGTases provenientes de *Bacillus* tendem a serem boas produtoras de  $\beta$ -CDs, independente do substrato utilizado (MATIOLI et al., 2000).

**Tabela 1:** Efeito do tipo de amido e concentrações de substrato na produção de ciclodextrinas pela CGTase do *Bacillus clausii* E16.

Tipo de Amido	Produção de CDs (mg/mL)				Conversão (%)
	alfa	beta	gama	total	
Amido solúvel <sup>a</sup>	0	8,25 ± 0,07	0,41 ± 0,01	8,66	86,60
Amido milho <sup>a</sup>	0	5,28 ± 0,16	0	5,28	52,80
Amido trigo <sup>a</sup>	0,53 ± 0,03	4,38 ± 0,15	0	4,91	49,10
Amido mandioca <sup>a</sup>	0,44 ± 0,04	8,57 ± 0,20	0,52 ± 0,04	9,53	95,30
Amido solúvel <sup>b</sup>	0	7,72 ± 0,08	0,71 ± 0,04	8,43	33,72
Amido milho <sup>b</sup>	0	4,93 ± 0,06	0,17 ± 0,03	5,1	20,40
Amido trigo <sup>b</sup>	1,07 ± 0,15	3,26 ± 0,28	0	3,33	13,32
Amido mandioca <sup>b</sup>	0,62 ± 0,06	8,56 ± 0,23	0,75 ± 0,04	9,93	39,72

Letras representam as concentrações de substrato: a: 1% e b: 2,5%.

Quando comparadas as concentrações de 1% e 2,5%, os resultados obtidos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apontaram produções de CDs muito próximas para ambas as concentrações estudadas em todos os tipos de amidos. Provavelmente esse resultado deve-se ao fato da enzima ter atingido sua velocidade máxima de consumo de substrato na concentração de 1%, sendo por isso que o aumento na concentração do substrato não apresentou alteração na formação do produto. A figura 1 (A e B) para os amidos: solúvel de batata PA (controle), de milho, de trigo e de mandioca nas concentrações 1,0% e 2,5% (p/v) ilustra os dados obtidos.



**Figura 1:** Produção de ciclodextrinas em diferentes amidos e concentrações A) 1% e B) 2,5% após 24h.

Trabalhos recentes descrevem a utilização de fontes alternativas de amido para a produção de ciclodextrinas. Charoenlap et al. (2004) estudou a produção de CDs a partir do amido proveniente de uma palmeira nativa da Ásia. Já Szerman e colaboradores (2007), observaram as condições para a produção de CDs utilizando-se a CGTase do *Bacillus circulans* DF 9R tendo o amido de mandioca como substrato. Matioli et al (2000) estudou a produção de CDs pela CGTase de *Bacillus firmus* em amidos de arroz, batata, milho e mandioca.

Pongsawasdi & Yagisawa (1988) estudaram a CGTase produzida por *Bacillus circulans* C31 e observaram que esta enzima, utilizando-se de amido solúvel 5% (p/v) como substrato, produziu uma taxa de conversão de 28% em  $\beta$ -CDs.

Gawande e colaboradores (1999) utilizando amido de mandioca gelatinizado como substrato para a ação da CGTase do *Bacillus firmus* (NCIM 5119), também obtiveram como principal produto  $\beta$ -CD, sendo a proporção de ciclodextrinas

encontradas de 0,2:9,2:0,6 para  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ , respectivamente. Outro estudo, realizado com a CGTase do *Bacillus firmus* n<sup>o</sup>37, tendo agora maltodextrina como substrato também produziu preferencialmente  $\beta$ -CD (MATIOLI et al., 2000).

Ainda em trabalho de Martins e Hatti-Kaul (2002) uma nova CGTase proveniente do *Bacillus agaradhaerens* LS-3C produziu preferencialmente  $\beta$ -CD (89% do número total de ciclodextrinas), tendo ainda menor produção de  $\alpha$ -CD, a proporção de CDs formadas foram  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$  igual a 0,79:4,37:0, sendo amido de milho o substrato usado.

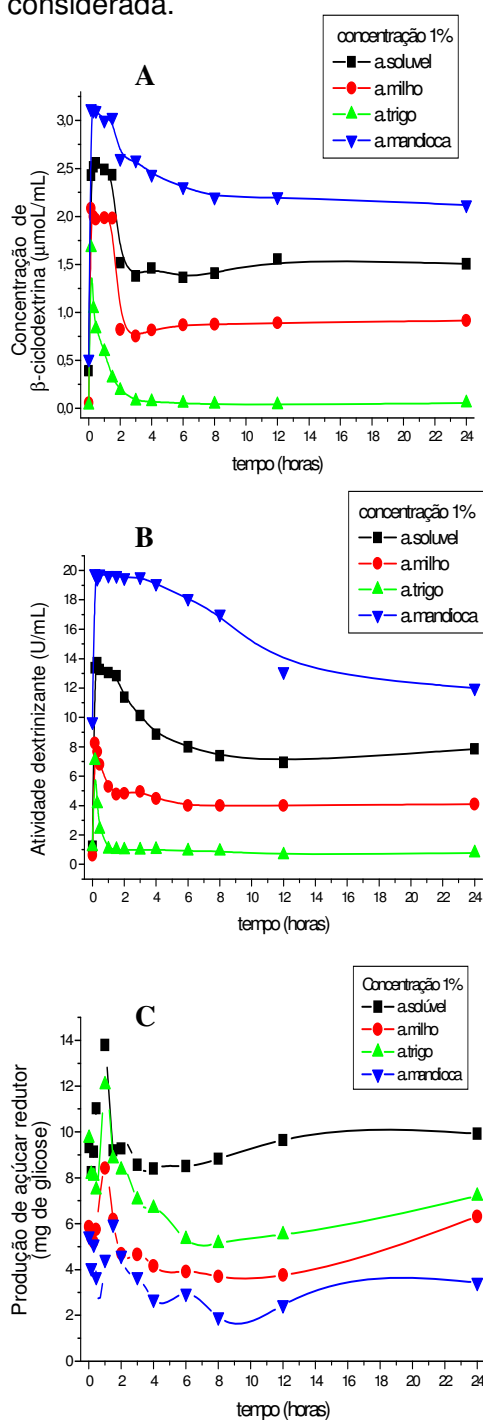
Charoenlap e colaboradores (2004) também obtiveram  $\beta$ -CD como produto predominante da ação da CGTase produzida pelo *Bacillus circulans* em amido de sagu, constituindo 65% de toda a ciclodextrina produzida. Outro estudo em que os autores obtiveram preferencialmente  $\beta$ -CD, foi realizado com a CGTase do *Bacillus megaterium*, o produto isolado de ciclodextrinas continha 75-79% de  $\beta$ -ciclodextrina e 4% e 6% de  $\alpha$ -ciclodextrina e  $\gamma$ -ciclodextrina, respectivamente (ZHEKOVA et al., 2009).

Visando o potencial da enzima para uso industrial, principalmente como produtora de  $\beta$ -CDs, estudou-se especificamente a enzima com relação a produção da  $\beta$ -CD, sua capacidade dextrinizante e de formação de açúcar redutor em 24h, nos diferentes amidos e concentrações (figuras 2 e 3).

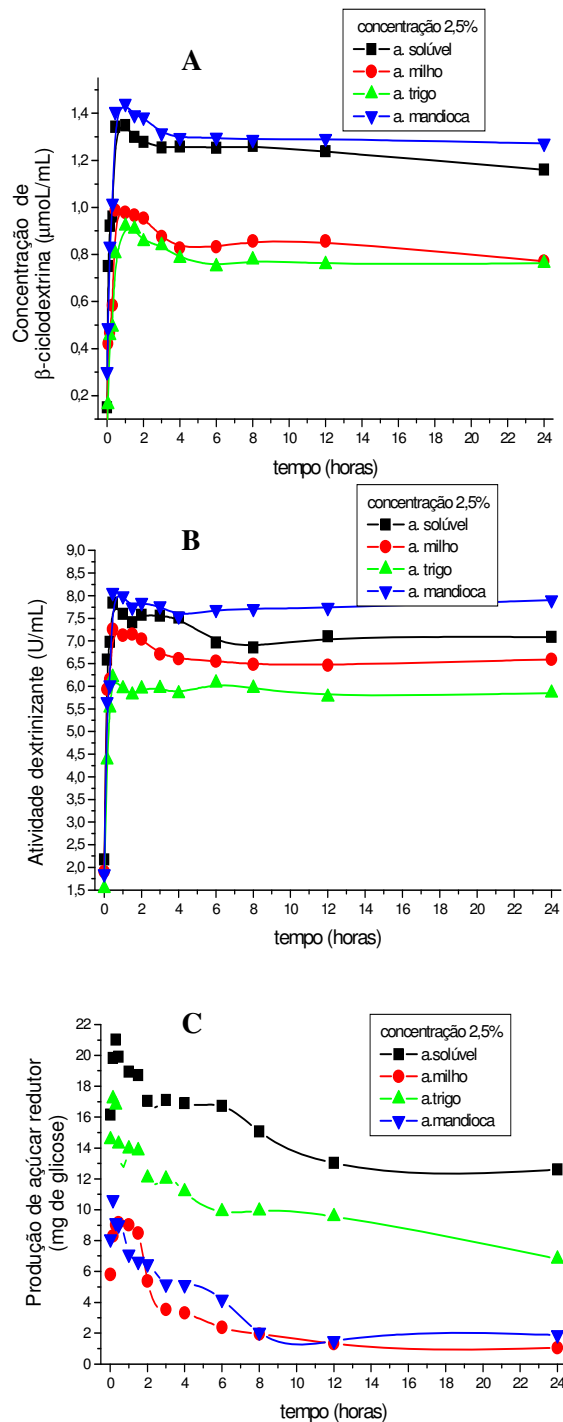
Os dados da capacidade dextrinizante (figura 2B e 3B) obtidos para ambas as concentrações de amidos (1% e 2,5%) apresentaram perfis semelhantes. O amido de mandioca foi o que apresentou a melhor dextrinização com relação aos demais amidos estudados. A maior parte do amido foi hidrolisado durante as duas primeiras horas de reação, o que está de acordo com os valores encontrados para a produção de CDs. Observou-se ainda, que após 12h de reação os níveis de produção de ciclodextrinas, capacidade dextrinizante e produção de açúcar redutor se mantiveram estáveis.

A produção de açúcares redutores dos demais amidos estudados foi sempre maior do que a apresentada para o amido de mandioca, devido a maior eficiência na formação de CDs pela ação enzimática da CGTase do *Bacillus clausii* E16 neste amido (figuras 2C e 3C). Em todos os substratos estudados, a produção de açúcar redutor ocorreu nas primeiras horas de reação, seguido de uma queda acentuada, estabilizando após 8 horas. Tal queda na produção dos açúcares redutores pode ser

atribuída a maior atividade de ciclização da CGTase nas primeiras horas de reação e a hipótese de perda de atividade enzimática ao longo do ensaio também deve ser considerada.



**Figura 2:** Perfil da CGTase do *Bacillus clausii* E16 em diferentes tipos de amido com relação a: **A)** produção de β-CDs; **B)** capacidade dextrinizante e **C)** formação de açúcar redutor. (substratos a 1%).



**Figura 3:** Perfil da CGTase do *Bacillus clausii* E16 em diferentes tipos de amido com relação a: **A)** produção de β-CDs; **B)** capacidade dextrinizante e **C)** formação de açúcar redutor. (substratos a 2,5%).

O perfil da produção de  $\beta$ -CDs também foi analisado estatisticamente. O resultado da análise de variância, mostrando o efeito dos fatores tipo de substrato (A) e concentração dos substratos (B) separadamente e ambos juntos (AB) na produção da enzima CGTase, estão representados na tabela 2.

**Tabela 2:** Quadro de Análise de Variância - Fator A: tipo de substrato e Fator B: concentração de substrato.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator A	3	2,2893	0,7631	11099,7273 **
Fator B	1	5,6051	5,6051	81528,3636 **
Fator Ax B	3	0,1235	0,1412	2053,1818 **
(Tratamentos)	7	8,3178	1,1883	
Resíduo	8	0,006	0.0001	

(\*\* =  $P < 0,01$ )

Observamos que o tipo de substrato (fator A) e a concentração de substrato (fator B) foram significativos ao nível de 1% de probabilidade, assim, exercem um efeito diferencial na produção das ciclodextrinas. A interação deste dois fatores analisada também apresentou nível de significância de 1% de probabilidade. Concluímos, que ambos os fatores, separadamente ou em interação influenciam na produção de ciclodextrinas. O grau de confiança foi superior a 99% de probabilidade. A media geral do ensaio foi de 1,7644 e o desvio padrão de 0,0083.

A influência do tipo e da concentração do substrato na produção de CDs ainda foi confirmado pela análise das médias do fator tipo de substrato pelo teste de Tukey (tabela 3), que indicou que os quatro tipos de amido testados apresentaram diferenças significativas entre si na produção de ciclodextrinas. O tratamento quatro (amido de mandioca) foi indicado como o melhor substrato dentre os testado para a produção de CDs pela CGTase obtida do *Bacillus clausii* E16, seguido pelo substrato um (amido solúvel), já os tratamentos dois (amido de milho) e três (amido de trigo) diferiram entre si e com relação os demais substratos testados.

Com relação a análise das médias do fator concentração de substrato pelo teste de Tukey com relação a produção de ciclodextrinas, observamos na tabela 4

que os tratamentos um e dois, concentrações de polvilho de 1% e 2,5% respectivamente, apresentaram diferenças significativas entre si, sendo que a concentração 1% foi apontada como a de melhor rendimento na produção de ciclodextrinas nestes estudo.

**Tabela 3:** Teste de Tukey para o fator Tipo de Substrato. (Tratamentos: 1 = amido solúvel (controle); 2 = amido de milho; 3 = amido de trigo e 4 = amido de mandioca).

TRAT.	MÉDIA	
4	2,2800	A
1	1,9475	B
2	1,5350	C
3	1,2950	D

**Tabela 4:** Teste de Tukey para o fator concentração de substrato. (Tratamentos: 1 = 1% e 2 = 2,5%).

TRAT.	MÉDIA	
1	2,3563	A
2	1,1725	B

Médias seguidas de letra distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ )

Concluimos que, tanto a concentração como o tipo de fonte vegetal de amido utilizado como substrato, interferem na produção de ciclodextrinas. Os resultados encontrados em nosso estudo são corroborados por dados da literatura.

Mori et al. (1994) estudaram a produção de CDs a partir da CGTase produzida por *Brevibacterium* sp n<sup>o</sup>9605 em diferentes tipos de substratos e obtiveram os melhores rendimentos com o amido de milho waxy solúvel, obtendo 36,1% de conversão, na qual a proporção da CDs foram  $\alpha:\beta:\gamma$  igual a 1,1:14,7:20,3.

Goel e Nene (1995) estudaram a ação da CGTase produzida pelo *Bacillus firmus* em diferentes substratos gelatinizados e crus. Dentre os tipos de substratos testados por eles, o de melhor rendimento foi o amido de mandioca, com cerca de 49% do amido convertido em CDs, tendo como principal produto da reação  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, 40% e 8%, respectivamente. No estudo de Bertolini e colaboradores (1998) a CGTase produzida por *Bacillus macerans* foi utilizada em dois tipos de substrato, fécula e farelo de mandioca, para a produção de ciclodextrinas. A fécula se mostrou melhor produtora de  $\beta$ -CD, enquanto o farelo obteve uma maior produção de  $\alpha$ -CD. A proporção encontrada de  $\alpha:\beta:\gamma$  foi igual a 1,0:1,4:0 para fécula e 1,5:1:0 para o farelo.

Gawande e colaboradores (1999) estudaram a ação da CGTase do *Bacillus firmus* em amido de mandioca gelatinizado e amido de trigo cru, ambos os substratos originaram como principal produto  $\beta$ -CD, sendo a proporção de ciclodextrinas  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$  encontradas de 0,2:9,2:0,6 para o amido de mandioca e 0,2:8,6:1,2 para o amido de trigo. Já em outro estudo deste autor (GAWANDE & PATKAR, 2001), foram utilizados, como substrato, amido solúvel gelatinizado e amido de trigo cru para a produção de CDs pela ação da enzima proveniente de *Klebsiella pneumoniae* AS-22. Obteve-se uma melhor produção de  $\alpha$ -CD em ambos os substratos testados, sendo a proporção encontrada de  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$  igual a 81:12:7 e 89:9:2, para o amido solúvel e o amido de trigo, respectivamente.

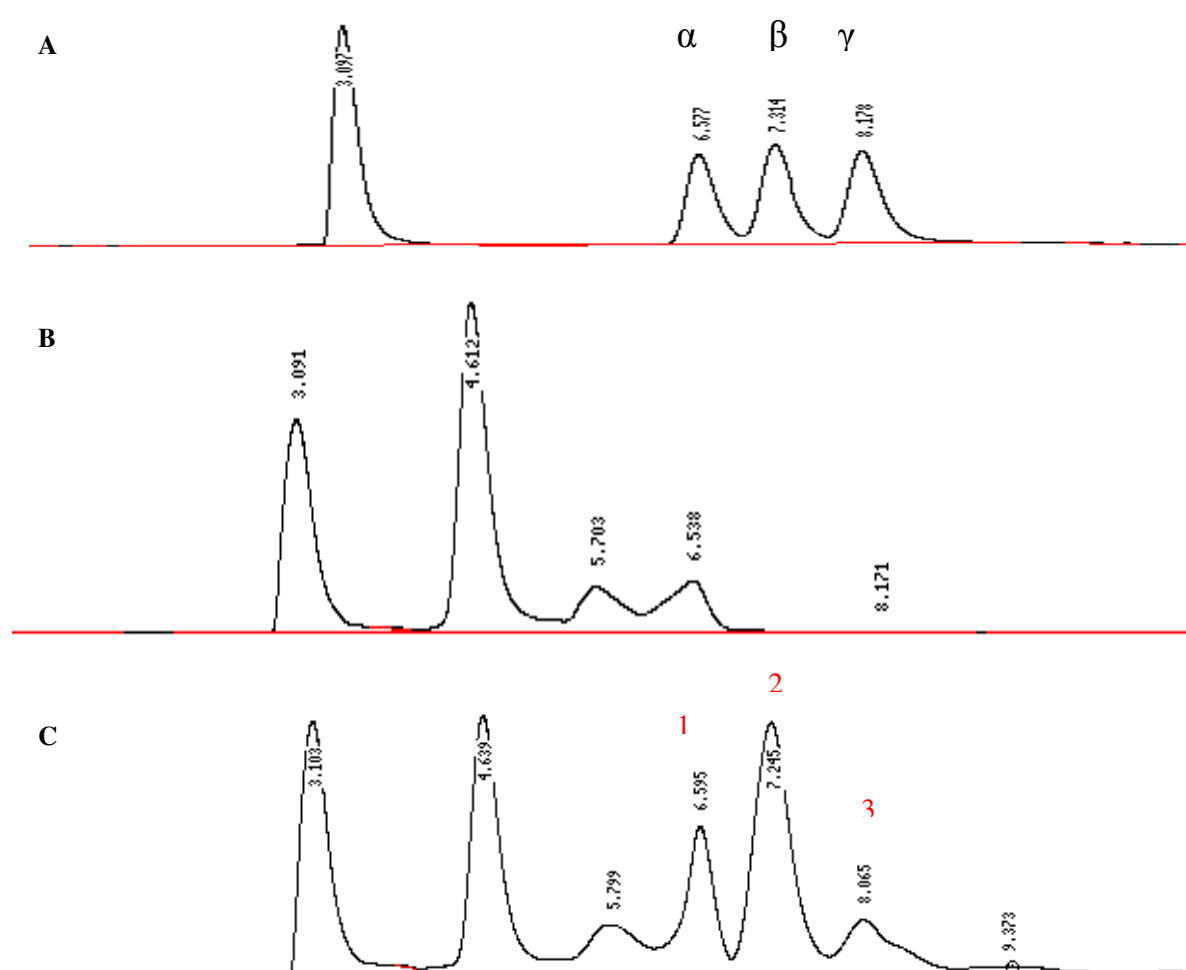
A produção de ciclodextrinas pela CGTase do *Bacillus firmus* foi estudada com relação ao efeito da fonte de substrato, e os substratos testados foram amido de arroz, batata, mandioca, milho e maltodextrina. O amido de milho foi o que se apresentou como melhor substrato na produção de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (MATIOLI et al., 2000)

Vários tipos de substratos foram testados para produção de ciclodextrinas com a CGTase do *Bacillus megaterium* em estudo de Pishtiyski & Zhekova (2006). A enzima produziu ciclodextrinas em vários tipos de substratos como amidos, dextrinas, amilose e amilopectina. Os amidos apresentaram-se como os melhores fontes para a conversão em ciclodextrinas, e dentre os amidos testados o de milho foi o que apresentou o melhor rendimento, apresentando produção de 50,9% de ciclodextrinas.

As análises estatísticas da produção de  $\beta$ -CD também corroboram o dados obtidos no estudo dos hidrolisados em análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que apontaram o amido de mandioca 1% como o melhor substrato para a produção de ciclodextrinas utilizando-se a CGTase do *Bacillus clausii* E16. O perfil cromatográfico da solução de amido de mandioca é apresentada na figura 4.

O melhor desempenho do amido de mandioca na produção de CDs comparado a outras fontes botânicas de amido pode ser entendido devido a uma série de fatores. De acordo com Franco et al (2001), os amidos podem ser classificados em função da susceptibilidade a ação das enzimas amilolíticas sobre os grânulos de amido. Esse autor cita em ordem decrescente de susceptibilidade os

amidos de milho ceroso, mandioca, sorgo ceroso, sorgo, milho, arroz, sagu, araruta e batata. Essa susceptibilidade estaria intrinsecamente associada ao teor de amilose/amilopectina do amido e este fator, ao longo dos anos, tem sido considerado como o de maior importância na determinação das propriedades funcionais dos amidos. Amidos de cereais apresentam cerca de 30% de amilose, enquanto os amidos de tuberosas em torno de 17% a 20%.



**Figura 4:** Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da amostra de amido de mandioca após ação da CGTase do *Bacillus clausii* E16: **A)** padrões  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CDs, concentração de 10mg/mL cada; **B)** solução de amido de mandioca 1% controle (sem adição da CGTase); **C)** solução de amido de mandioca 1% após 1h de atuação da CGTase (picos 1, 2 e 3 apresentaram tempo de retenção semelhantes aos dos padrões  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CDs).

Segundo Rickard e colaboradores (1991) os grânulos de amido de mandioca, entre os amidos de outras fontes botânicas que não os cereais, são dos menos resistentes a degradação enzimática. O menor teor de amilose em tubérculos estaria associado a uma menor retrogradação natural do amido, o que facilitaria a ação enzimática.

Entretanto, outros componentes menores, também presentes no amido após sua extração, podem influenciar as propriedades que determinam sua aplicação, como proteínas, lipídios, fibras e sais minerais. Segundo Mestres (1996, apud FRANCO et al., 2001) a quantidade de lipídios presentes nos amidos afetam singularmente as propriedades funcionais deste. O autor observou que os cereais apresentam elevados teores de lipídios, e que esses não podem ser retirados com muita facilidade por ocasião da extração de seus amidos, como consequência parte dos lipídios permanecem nos amidos dos cereais, sendo responsáveis por propriedades funcionais destes. A maioria dos lipídios presentes nos amidos de cereais encontram-se como lisofosfolípidios, nos quais uma cadeia de ácido graxo encontra-se esterificada com ácido fosfórico. Já nos amidos de tuberosas, os teores de lipídios são naturalmente baixos, abaixo de 1%, o que faz deste amidos os mais neutros e menos sujeitos a complexações.

Outro fator que teria muita importância nas propriedades funcionais dos amidos é o teor e o tipo do fósforo. Kasemsuwan e Jane (1994) afirmam que o mono-éster fosfato presente em amidos de raízes e tubérculos promovem sua natureza hidrofílica por introduzir nas cadeias de amido os grupos fosfatos carregados negativamente, aumentando a sua capacidade de ligação com a água, poder de inchamento, claridade da pasta e suscetibilidade enzimática. Por sua vez, os lisofosfolípidios são as maiores fontes de fósforo em amidos de cereais; estes formam complexos helicoidais com os amidos reduzindo a capacidade de ligação destes com a água, e acabam dificultando a ação enzimática no amido.

Portanto, de acordo com a literatura especializada, vários fatores podem elucidar e corroborar o melhor desempenho obtido neste estudo pelo amido de mandioca (tubérculo) como substrato na produção de ciclodextrinas em comparação a outras fontes de amido como milho e trigo (cereais). O menor teor de amilose, o baixo teor de lipídios e o tipo de fósforo presente em tubérculos, seriam os primordiais fatores responsáveis por esse melhor desempenho do amido de

mandioca na produção de CDs, pois temos menor retrogradação e ausência da formação dos complexos fosfolipídicos, comumente encontrados em cereais e grãos, que impossibilitam nestes últimos, a ação completa das enzimas amilolíticas nos grânulos de amidos.

## **CONCLUSÕES**

Neste estudo observou-se que a enzima produziu preferencialmente  $\beta$ -CD nos diferentes tipos de substrato utilizados (amido solúvel, de milho, de trigo e de mandioca).

O mais alto grau de conversão de CDs foi obtido com o uso de amido de mandioca, tendo convertido 95,30% (p/p) em  $\beta$ -CD, seguido de 86,60% (p/p) do amido solúvel.

No estudo do efeito do tipo de substrato e da concentração do substrato na produção das CDs, o amido de mandioca na concentração de 1%, obteve o melhor rendimento sobre todos os amidos testados como substratos.

## REFERÊNCIAS

- ABAM. Associação brasileira de produtores de amido de mandioca, 2008 <http://www.abam.com.br>, acessado em 02/09/2008.
- ALLEGRE, M. AND DERATANI, A. Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality. *Agroo Food Industry Hi Tech*. p. 9-17, January/February, 1994.
- ALVES PRADO, H. F. Estudo da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus* sp alcalofílico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 2000, p.188.
- ALVES PRADO, H. F.; GOMES, E. and DA SILVA, R. Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), microbiana e aplicação de ciclodextrinas em alimentos: Revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos*. v. 36, n. 1, p. 43-54, 2002.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. Estatística aplicada á engenharia de alimentos. Unesp – campus de Jaboticabal, 2002, p.109.
- BENDER, H. Production, Characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*. v.6, p. 31-71, 1986.
- BERTOLINI, A.C., CEREDA, M.P., CHUZEL, G. Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*. v.18 (2), p. 224-229, 1998.
- CHAROENLAP, N., DHARMSTHITI, S., SIRISANSANEYAKUL, S., LERTSIRI, S. Optimization of cyclodextrin production from sago starch. *Bioresearch Technology*, v.92, p.49-54, 2004.
- CUCOLO, G.R. Produção e caracterização da CGTase de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e aplicação da enzima em produtos de panificação. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, 2004, p.127.
- FRANCO, C.M.L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L.J.C.B.; LEONEL, M.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O. and SARMENTO, S.B.S. Propriedades gerais do amido. In: *Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas V1*. CEREDA, M.P. (coord.). São Paulo: Fundação Cargill, 2001. p.224.

- FUWA, H. A new method for micro determination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. *J. Biochem.* v. 41, p. 583-603, 1954
- GAWANDE, B. N.; GOEL, A.; PATKAR, A. NENE, S. N. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucoamylase from *Bacillus firmus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.51, p. 504-509, 1999
- GAWANDE, B. N. e PATKAR, A. Y. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme and Microbial Technology*. v.28, n. 9-10, p. 735-743, 2001.
- GOEL, A. AND NENE, S. A novel cyclomaltodextrin glucoamylase from *Bacillus firmus* that degrades raw starch. *Biotechnology Letters*, v.14, n. 4, p 411-416, 1995.
- HAMILTON, L.M., KELLY, C.T., FOGARTY, W.M. Review: Cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p.561-567, 2000.
- KASEMSUWAN, T. AND JANE, J. Location of amylose in normal starch granules. II. Locations of phosphodiester cross-linking revealed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Cereal Chemistry*, v.71, n.3, p.282-287, 1994.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A L. and RANDAL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-75, 1951.
- MAKELA, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO, J. and LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. *Journal Agric. Food Chem.* v. 36, p. 83-88, 1988.
- MARTINS, R. F. AND HATTI-KAUL, R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30,p. 116-124, 2002.
- MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; GUIMARÃES, M. F. and MORAES, F. F. Enhancement of selectivity for producing  $\gamma$ -cyclodextrin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.84-86, p.955-962, 2000.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-8, 1959.

- MORI, S.; HIROSE, S.; OYA, T. and KITAHATA, S. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. v.58, n. 11, p. 1968-1972, 1994.
- PISHTIYSKI, I. AND ZHEKOVA, B. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v22, p. 109-114, 2006.
- PONGSAWASDI, P. AND YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. *Journal Fermentation Technology*. v.65, n.4, p. 463-467, 1987.
- PONGSAWASDI, P. AND YAGISAWA, M. Purification and some properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. *Agricultural and Biological Chemistry* v.52, n.5, p. 1099-1103, 1988.
- PSZCZOLA, D. E. Production and potential food applications of cyclodextrins. *Food Technology*. January, p.96-100, 1988.
- RAJA, K. C. M.; SREEDHARAN, V. P.; PREMA, P.; RAMAKRISHNA, S. V. Cyclodextrin from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch. Isolation and characterization as bromobenzene and chloroform chathrates. *Starch*, v.42 (5), p.196-198, 1990.
- RENDLEMAN JR., J. A. Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* v. 26, p. 51-61, 1997.
- RICKARD, J. E.; ASAOKA, M. AND BLANSHARD, J. M. V.** *The physicochemical properties of cassava starch. Tropical Science*, v. 31, n. 22, p. 189-207, 1991.
- ROBYT, J. F. *Essentials of carbohydrate chemistry*. New York. Springer, 1998. Cap. 6, p. 160-168.
- SATO, M.; YAGI, Y.; NAGANO, H. AND ISHIKURA, T. Determination of CGTase from *Bacillus ohbensis* and its optimum pH using HPLC. *Agric. Biol. Chem.* v.49, n.4, p. 1189-1191, 1985.
- SINGH, M., SHARMA, R. AND BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrin. *Biotechnology Advances*, v.20, p.341-359, 2002.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrin in food, cosmetic and toiletries. *Starch/Stärke*. v.34, n.11, p.379-385, 1982.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin in Pesticides. *Starch/Stärke*. v.37, n.11, p.382-386, 1985

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

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

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

YU, E. K. C.; AOKI, H. and MISAWA, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied Microbiol Biotechnol.* v.28, p. 377-379, 1988.

ZHEKOVA B., DOBREV, G., STANCHEV, V., PISHTIYSKI I. Approaches for yield increase of  $\beta$ -cyclodextrin formed by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v25, n 46, p. 1043-1049, 2009.

### **CAPÍTULO III**

## **USO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS E OUTRAS FONTES DE AMIDO COMO SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS**

## USO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS E OUTRAS FONTES DE AMIDO COMO SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS

### USE OF AGROINDUSTRIAL RESIDUES AND ANOTHER STARCH SOURCES AS SUBSTRATE FOR CYCLODEXTRINS PRODUCTION

Gisele Rodrigues Cucolo<sup>1</sup>, Maurício Boscolo<sup>2</sup> e Roberto da Silva\*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE / UNESP

<sup>2</sup>Laboratório de Físico - Química – IBILCE / UNESP

\*e-mail: [dasilva@ibilce.unesp.br](mailto:dasilva@ibilce.unesp.br)

#### RESUMO

Ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é uma enzima capaz de formar a partir do amido moléculas de ciclodextrinas (CDs). CDs tem sido crescentemente populares nas indústrias farmacêuticas, químicas, cosméticas e alimentícias. CDs são moléculas cíclicas formadas por monômeros de glicoses, unidos por ligações  $\alpha$ -1,4. Os tipos mais comuns são os  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - CD, de 6, 7 e 8 monômeros de glicose, respectivamente. A molécula de CD possui uma estrutura única com a cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica. Como resultado, CDs podem formar complexos de inclusão com uma variedade de moléculas hidrofóbicas, que tem melhorada ou protegida suas propriedades físico-químicas. O objetivo deste estudo foi a aplicação CGTase do *Bacillus clausii* E16 em fontes alternativas de substrato (farelo de trigo, farelo de mandioca; farinhas de milho, trigo e mandioca) para a produção de CDs. Observou-se que a enzima produziu  $\beta$ -CD nos diferentes tipos de substrato utilizados. O grau de conversão de CDs obtido, utilizando-se farelo de mandioca, foi de 40,48% (p/p) em  $\beta$ -CD e estudos preliminares de encapsulação molecular apontaram a complexação de aroma de limão com as ciclodextrinas produzidas neste substrato.

**Palavras-chaves:** CGTase. Ciclodextrina. Farelo de mandioca. *Bacillus clausii*.

#### SUMMARY

Cyclodextrin glycosyltransferase is an enzyme capable of converting starch into cyclodextrin (CD) molecule. CDs are becoming increasingly popular in pharmaceutical, chemical, cosmetics and food industries. CDs are cyclic

oligosaccharides compounded of glucose units jointed by  $\alpha$ -1,4 linkages. The most common types of cyclodextrins,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ - CD, consist of 6, 7 and 8 glucose units, respectively. A CD molecule has a unique torus-shaped structure with a hydrophobic internal cavity and a hydrophilic external surface. As a result, CDs can form inclusion complexes with many hydrophobic guest molecules and thereby change their physical and chemical properties. The aim of this work was studied the application of a CGTase from *Bacillus clausii* E16 in alternative substrate sources (cassava bran, wheat bran; corn meal, wheat flour e cassava flour) for production of cyclodextrins. It was noticed that the enzyme produced  $\beta$ -CD with the different types of used substrate. The degree of conversion of CDs obtained with the use cassava bran was 40,48% (w/w) in  $\beta$ -CD and preliminary studies of molecular encapsulation pointed to a complexation of the lemon flavor with the cyclodextrins produce in this substrate.

**Key words:** CGTase. Cyclodextrin, Cassava bran. *Bacillus clausii*.

## INTRODUÇÃO

Ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase; EC 2.4.1.19) é uma enzima que apresenta sua ação catalítica em substratos com ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, como amido, amilose, amilopectina, dextrinas e glicose, produzindo ciclodextrinas (CDs) (QI & ZIMMERMANN, 2005). CDs são moléculas cíclicas formadas por unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, as mais conhecidas são do tipo  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD, consistindo de seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (BENDER, 1986; PSZCZOLA, 1988; YU et al, 1988).

Devido a estrutura circular das CDs, que consiste em exterior hidrofílico e uma cavidade central hidrofóbica, elas são capazes de formar complexos de inclusão cristalinos com uma variedade de compostos químicos orgânicos e inorgânicos, pela incorporação desses no interior da cavidade hidrofóbica dessas moléculas. A propriedade mais notável das CDs é sua capacidade de formar compostos de inclusão em solução aquosa, na qual moléculas de dimensões compatíveis são incluídas dentro da cavidade da ciclodextrina sem formação de ligações covalentes. Todas as moléculas encapsuladas são acomodadas, desde hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos apolares à compostos polares como ácidos e aminas (AGUIAR, 2001).

Compostos de inclusão com ciclodextrinas, devido à estabilidade dos complexos cristalinos originados, apresentam potencial para as indústrias alimentícia, farmacêutica, de fermentações e química fina (na preparação, separação e purificação de compostos), bem como, na encapsulação de produtos como fragrâncias, fármacos (esteróis) e liberação controlada de compostos biologicamente ativos (medicamentos e pesticidas) (SZEJTLI, 1982; SZEJTLI, 1985; BENDER, 1986; PSZCZOLA, 1988; FOGARTY & KELLY, 1990; SABIONI, 1994; ALLEGRE & DERATANI, 1994; SZEJTLI, 1997; ALVES PRADO, 2000; SINGH et al., 2002). Atualmente, as indústrias de alimentos e de cosméticos utilizam 84% da produção mundial de CDs (ALVES PRADO et al, 2002).

A melhora na produção de CDs têm sido o objetivo de muitos pesquisadores em todo o mundo e o interesse em novas técnicas para a produção de CDs ou o aperfeiçoamento das já existentes, visando o aumento da produção, ganharam grande importância devido o crescente uso de produtos empregando CDs. Estudos que enfocam microrganismos com boa atividade de CGTase, trabalhos sobre otimização de atividade de CGTase e as condições de reação e métodos de recuperação de CDs e purificação de CGTases têm sido freqüentes. Rendleman Jr. (1997) que obteve melhoras significativas no rendimento de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD utilizando a CGTase de *Bacillus macerans* associada a complexantes específicos e a enzimas desramificantes. Cucolo (2006) estudou a otimização da produção da CGTase de do *Bacillus clausii* subgrupo E16 em meio contendo polvilho doce em substituição ao amido solúvel, obtendo melhora considerável na produção da enzima. Matioli et al (2000) estudou a produção de  $\gamma$ -CD pela CGTase de *Bacillus firmus*, onde observaram um aumento considerável na produção deste tipo de CD na presença do complexante glicerizina. Entretanto, são poucos os artigos que enfocam a minimização dos custos da produção de CDs através do estudo do substrato.

Amido é o substrato mais comumente utilizado na produção de CDs. De acordo com Sian et al. (2005), são utilizadas para a produção de ciclodextrinas diferentes fontes de amidos (milho, batata, trigo, arroz, mandioca). Dentre estes amidos, o de batata e o de milho são os substratos mais empregados na produção de CDs (RAJA et al., 1990), mas outras substratos, além do amido, podem ser utilizadas como a maltodextrina e outros insumos agrícolas.

Em 2007, a produção nacional de fécula de mandioca estimada foi de 545 mil toneladas, a receita obtida com as vendas internas de fécula foi 28,6% superior ao

montante de 2006, passando de R\$ 373,6 milhões naquele ano para R\$ 480,3 milhões em 2007 (ABAM, 2008). Essas fecularias geram resíduos, como farelo de mandioca, que apresenta em média 15% de fibras e 70% de amido. A fécula de mandioca e derivados, e o seu resíduo (devido o seu teor de amido, alta disponibilidade e baixo custo) são potenciais substratos para produção de CDs (BERTOLINI et al., 1998), sendo que o emprego de resíduos como matéria prima é importante como estratégia governamental e para o balanço ambiental.

Temos ainda, que a economia brasileira é dependente de vários produtos agro-industriais que geram grandes quantidades de resíduos agrícolas e agroindustriais. Estima-se que sejam gerados 1000 t/ano de resíduos agrícolas e agroindustriais no Brasil. Grande parte desses resíduos acumulam-se no campo e devido aos problemas para descarte, muitas vezes, acabam tornando-se um poluente ambiental (YANG et al., 2001). Pesquisas visando a utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais como substratos para produção de ciclodextrinas apresenta grande importância sob o aspecto sócio-econômico, visto que tais substratos são baratos e “exigem baixa tecnologias”, além do que, o seu aproveitamento geraria menor impacto ao meio ambiente (RAIMBAULT, 1998). Subprodutos agroindustriais como farelo de trigo vem sendo amplamente utilizados para o crescimento microbiano e produção de enzimas. De acordo com Pandey et al (2000), existem muitos microrganismos capazes de realizar a bioconversão do farelo de mandioca, apesar desse material ser pouco explorado.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o estudo da produção de ciclodextrinas pela CGTase produzida pelo *Bacillus clausii* E16 em resíduos agrícolas, tais como o farelo de mandioca e trigo em comparação a outras fontes de amido de fácil acesso e baixo custo como farinhas de trigo, milho e mandioca, com ou sem pré-tratamentos e ainda, se houve indícios da inclusão do aroma de limão nas ciclodextrinas produzidas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Reagentes**

Padrões de ciclodextrinas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD) foram adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Amido solúvel de batata PA foi obtido de Mallinckrodt (Paris, França). O farelo de mandioca e o farelo de trigo cedidos pelo Laboratório de Bioprocessos do

Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos (IBILCE-UNESP, SP, Brasil). As farinha de milho e mandioca fabricados por Yoki Alimentos S.A (São Paulo, Brasil) e farinha de trigo tipo 1 Renata produzida por Pastifício Selmi (São Paulo, Brasil). Extrato de levedura foi adquirido da Difco (Detroit, EUA) e a peptona foi obtida da Biobrás (Minas Gerais, Brasil). Outros reagentes químicos analíticos foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). As enzimas utilizadas enzimas  $\alpha$ -amilase (Termamyl 120 L), amiloglucosidase (AMG 1100 BG) e CGTase Comercial (Toruzyme) foram cedidas pela Novozymes (Carolina do Norte, EUA).

### **Microrganismo e condições de produção da CGTase**

A CGTase usada neste estudo foi obtida do *Bacillus clausii* E16 que é parte da coleção de microrganismos do LBMA-UNESP (ALVES PRADO,2000). O microrganismo foi cultivado em fermentação líquida, em erlenmeyer de 250mL que continha 40mL de meio nutriente alcalino otimizado composto por 13,4g/L de amido solúvel, 4,9g/L de peptona, 5,9g/L de extrato de levedura, 1,0g/L de  $K_2HPO_4$ , 0,2g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 12,5g/L de  $Na_2CO_3$  (esterilizado separadamente), pH 10,1 (ALVES PRADO, 2000), mantidos sob agitação de 200rpm, a 35°C. Após 48h, o material bacteriano foi centrifugado a 10000xg, por 15 minutos, sob refrigeração de 5°C e o sobrenadante, livre das células, foi usado como CGTase bruta.

### **Purificação parcial da CGTase**

Com a intenção de utilização da enzima em alimentos, esta foi parcialmente purificada. O sobrenadante contendo a enzima bruta foi concentrada pelo sistema de ultrafiltração Pellicon<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, USA), de 10kDa com 50cm<sup>2</sup> de área. A CGTase concentrada foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel Sephadex superfina G-50 (coluna 2,6cm diâmetro x 100cm altura) pré-equilibrada com 20mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5), contendo 20mM NaCl. A eluição foi realizada no mesmo tampão anterior com fluxo de 0,3mL/min, e frações de 4mL foram coletadas usando o coletor de frações (Pharmacia Biotech Frac-100, Sweden). As frações que continham atividade CGTase foram concentradas pelo Centriprep<sup>®</sup> YM-10 (Amicon Bioseparations, Millipore, Bedford, MA, USA) de 10kDa. A CGTase comercial também foi semi-purificada e submetida a uma cromatografia de filtração em gel Sephadex superfina G-50, como descrito anteriormente para a CGTase E16, com o objetivo de uniformizar as condições de ambas as enzimas.

### **Análises da atividade CGTase**

A atividade CGTase foi analisada pelos métodos:

**1- Dextrinizante** descrito por Fuwa (1954) e Pongsawasdi & Yagisawa (1987) com algumas modificações. A reação foi composta por 0,1mL da solução enzimática, convenientemente diluída, adicionado a 0,3mL de solução de amido de batata solúvel PA a 0,5%, em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,6. Após incubação a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0mL de solução de HCl 0,2M. Em seguida, a reação recebeu 0,5mL de reativo de iodo (0,30% de KI e 0,03% de I<sub>2</sub>). A mistura de reação foi diluída com 10mL de água destilada. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente de enzima inativa. A absorbância determinada a 700nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo iodo-amido por minuto.

**2- CD - fenolftaleína** baseado no método proposto por Makela et al (1988), onde 0,1mL de solução enzimática diluída foi adicionada 0,8mL de solução de amido solúvel PA a 1,0%, em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,6. Após incubação a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 4,0mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,25M. Em seguida, acrescentou-se 0,1mL de solução de fenolftaleína a 1mM. O controle recebeu a solução enzimática apenas no momento da leitura. A absorbância determinada em 550nm. Uma unidade de atividade enzimática pelo método CD-fenolftaleína foi definida como a quantidade de enzima, necessária para produzir 1µmol de β-ciclodextrina, por minuto e por mL de solução enzimática.

### **Determinação do açúcar redutor e de proteína**

A quantidade de açúcar redutor formado pela enzima será analisada de acordo com o método padrão de DNS descrito por Miller (1959). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al (1951), usando soro albumina bovina como padrão.

### **Produção de CDs em resíduos agro-industriais e outras fontes de amido**

Foi observada a ação da CGTase E16 sobre os resíduos: farelo de trigo e farelo de mandioca na concentração de 5% (p/v); sob as farinhas de: milho, trigo e mandioca 2,5% (p/v). A solução com os substratos foram preparadas em tampão

acetato de sódio, 100mM, pH 5,5. Todas as soluções contendo os substratos sofreram um pré-tratamento sendo autoclavadas a 120°C por 10 minutos a 1atm. Em seguida foi adicionado 1mL de CGTase (4U/mL) para cada 100mL de solução. A reação foi misturada e incubada em banho-maria em agitação de 100rpm a 55°C por 24h. Alíquotas de 1mL foram retiradas periodicamente e prontamente fechadas e submetidas a inativação da enzima em fervura. Estas foram centrifugadas, filtradas e a formação de CDs foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A conversão de CDs foi calculada pelo total de gramas de CDs formadas dividido por grama de substrato e multiplicado por 100.

### **Quantificação das CDs produzidas**

Os tipos de CDs formadas foram avaliadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. As condições da CLAE foram baseadas no descrito por Sato (1995). O sistema de CLAE consistiu da bomba Jasco PU 990 (Jasco Corporation, Japão) conectada a um detector de índice de refração Shodex RI 72. No sistema, foi conectado a coluna Zorbax Carbohydrates (250mm x 4,6mm, 5 $\mu$ , Aligent Technologies) instalada no forno em coluna Dionex STH 585 (Dionex Softron GmbH, Germany) a 35°C usando uma mistura de acetonitrila/água (65:35; v/v), corrida isocrática com um fluxo de 1,0mL/min.

### **Produção de CDs em farelo de mandioca em diferentes tratamentos**

A ação da CGTase obtida do *Bacillus clausii* E16 quanto a produção de CDs foi estudada sobre o farelo de mandioca 5% (p/v), com e sem tratamentos. As soluções com o substrato farelo de mandioca, foram preparadas em tampão acetato de sódio, 100mM pH 5,5, estas sofreram tratamentos enzimáticos antes ou após a ação da CGTase. Foram utilizadas no pré tratamento as enzimas:  $\alpha$ -amilase, amiloglicosidase (AMG) e a junção de ambas, por 2h a 55°C, antes da aplicação da CGTase. A ação dessas enzimas foi paralisada em banho de fervura por 10 minutos, seguido de banho de gelo. Em seguida as soluções foram novamente colocadas em banho-maria a 55°C e após a solução atingir a temperatura desejada foi aplicada 1mL de CGTase (4U/mL), para cada 100mL de solução. A reação foi misturada e incubada em banho-maria em agitação de 100rpm a 55°C por 2h. O pós tratamento consistiu da adição da enzima AMG na solução contendo farelo de mandioca sem pré tratamento anterior e após a ação da CGTase. Amostras controles para os pré

tratamentos foram realizadas sem a posterior adição de CGTase. A formação de ciclodextrinas foi determinada por CLAE. A conversão de CD foi calculada pelo total de gramas de CDs formadas dividido por grama de substrato e multiplicado por 100.

### **Produção de CDs e secagem em spray dryer**

Foram utilizados os melhores resultados encontrados no experimento anterior da ação da enzima da CGTase obtida do *Bacillus clausii* E16 sobre o resíduo farelo de mandioca na concentração de 5% (p/v) na produção de ciclodextrinas. Foi estudada a produção de ciclodextrinas sobre o farelo de mandioca somente com o uso da CGTase E16 com e sem o pré-tratamento pela enzima  $\alpha$ -amilase, e comparada com a ação da CGTase comercial. As soluções com o substrato foram preparadas em tampão acetato, 100mM pH 5,5. As soluções foram autoclavadas a 120°C por 10 minutos a 1atm antes da ação enzimática. Na amostra com o pré tratamento, a  $\alpha$ -amilase foi adicionada e atuou por 2 horas a 55°C, antes da aplicação da CGTase. A ação dessa enzima foi paralisada em banho de fervura por 10 minutos seguido de banho de gelo. Em seguida a solução foi novamente colocada em banho-maria a 55°C e após a solução atingir a temperatura desejada foi aplicada 1mL de CGTase (4U/mL), para cada 100mL de solução. Para a amostra sem pré tratamento foi adicionado 1mL de CGTase (4U/mL) do *Bacillus clausii* E16 para cada 100mL de solução e para a CGTase comercial foi adicionado 0,2mL (16U/mL) para cada 100mL de solução. A reação foi misturada e incubada em banho-maria em agitação de 100rpm a 55°C por 2h. A formação de CD foi determinada bioquimicamente pelo método CD-fenoltaleína. A conversão de CD foi calculada pelo total de gramas de CDs formadas dividido por grama de substrato e multiplicado por 100. A secagem das soluções contendo a CDs produzidas em farelo de mandioca foi realizada por "spray dryer (Mini-Spray Dryer MSD 0.5 da LABMAQ do Brasil Ltda). As condições operacionais de secagem foram: temperatura do ar de secagem de entrada 90°C e saída 60°C; vazão média do ar de secagem: 0,30m<sup>3</sup>/min; vazão média de alimentação: 0,014L/h.

### **Encapsulação de aroma de limão em CDs produzidas em farelo de mandioca**

O método de precipitação utilizado para promover a complexação do aroma de limão com as CDs produzidas pela CGTase E16 foi o descrito por Bhandari e colaboradores (1998). Foram utilizados 5g do pó seco, contendo as  $\beta$ -ciclodextrinas

produzidas em farelo de mandioca, dissolvidos em 50mL de uma mistura contendo etanol:agua (2:1) mantida aquecida a 55°C ( $\pm$  2°C) em agitador magnético. Para a complexação com as CDs o aroma de limão puro foi dissolvido em etanol (10% v/v). No processo de encapsulação foi utilizado uma mistura de solução de  $\beta$ -ciclodextrinas/aroma de limão na proporção de 85:15 (v/v). Durante a adição lenta da solução de aroma de limão a solução de  $\beta$ -ciclodextrinas, a mistura foi continuamente agitada e mantida aquecida a 55°C. Após o termino da adição do aroma o aquecimento foi parado, a mistura resultante foi coberta com parafilme e mantida em agitação por 4h. Em seguida foi levada a refrigeração (4°C) e mantida por toda a noite. O precipitado formado pelas  $\beta$ -ciclodextrinas e pelo aroma foi recuperado por filtração, e seco em estufa convencional a 50°C, por 24h. O pó recuperado e seco contendo o produto encapsulado foi acondicionado separadamente em frasco de vidro com tampa de borracha e selado com parafilme, a fim de permitir análises do tipo "Headspace". Headspace (ou espaço confinante) é o volume no recipiente de amostragem onde se concentra o vapor da amostra, análises do tipo "Headspace" consistem na retirada desse vapor da amostra, para injeção no cromatógrafo. O mesmo procedimento de encapsulação descrito acima foi realizado com sílica (100 a 200Mesh) e aroma de limão, e somente com as ciclodextrinas produzidas em farelo sem adição de aroma, para servirem de controles. Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

### **Análise da retenção de aroma pelas CDs**

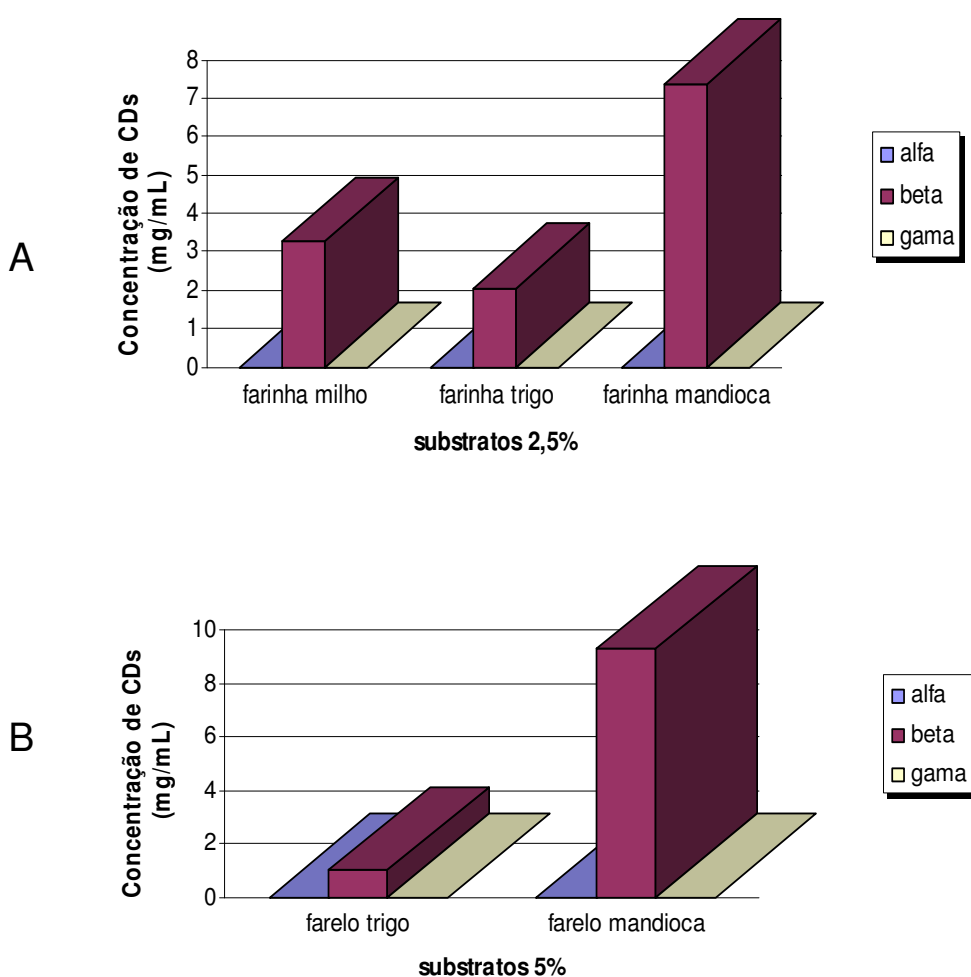
A amostra da ciclodextrina e da sílica que foi usada para encapsulação, após secagem, e 1mL do aroma de limão e 2g de ciclodextrina produzida em farelo de mandioca, foram acondicionadas separadamente em frascos de vidro com tampas de borracha e selados com parafilme, a fim de permitirem análises do tipo "Headspace". Estas foram analisadas por "Headspace" em cromatografia gasosa - FID em aparelho HP 5890 serie II acoplado a detector de ionização de chama e coluna FFPA (25m, 0,25mm di, 0,3 $\mu$  filme) com gás nitrogênio (20psig) e um forno programado com temperatura inicial de 50°C por 5 minutos seguidos de um aumento de 10°C por minuto até atingir a temperatura de 220°C e esta mantida por 5 minutos. A temperatura do detector foi de 250°C. Antes das aplicações as amostras foram aquecidas a 50°C. Um volume de 30 $\mu$ L de gases de cada amostra foi injetado com split (1:20) com seringa de 100 $\mu$ L no cromatógrafo gasoso.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Produção de CDs em resíduos agro-industriais e outras fontes de amido

No estudo da ação da enzima CGTase produzida pelo *Bacillus clausii* E16 sobre resíduos agro-industriais farelo de trigo e farelo de mandioca e outras fontes de carbono (farinha de milho, farinha de trigo e farinha de mandioca). Observou-se que as fontes de amido, originadas da mandioca, apresentaram o melhor rendimento na produção de CDs.

Para as farinhas testadas, a farinha de mandioca (figura 1A) converteu 29,52% do substrato em ciclodextrinas (tabela1). Para os farelos, o melhor desempenho foi o do farelo de mandioca (figura 1B), que apresentou um grau de conversão 18,58% em CDs (tabela 1).



**Figura 1:** Produção de ciclodextrinas em : **A)** farinhas (2,5%); **B)** farelos (5%).

**Tabela 1:** Produção de CDs em resíduos agro-industriais e fontes alternativas de amido pela CGTase do *Bacillus clausii* E16.

Tipo de Amido	Produção de CDs (mg/mL)			total	Conversão (%)
	alfa	Beta	gama		
farinha milho <sup>a</sup>	0	3,26 ± 0,19	0	3,26	13,04%
farinha trigo <sup>a</sup>	0	2,06 ± 0,20	0	2,06	8,24%
farinha mandioca <sup>a</sup>	0	7,38 ± 0,08	0	7,38	29,52%
farelo trigo <sup>b</sup>	0	1,01 ± 0,17	0	1,01	2,02%
farelo mandioca <sup>b</sup>	0	9,29 ± 0,31	0	9,29	18,58%

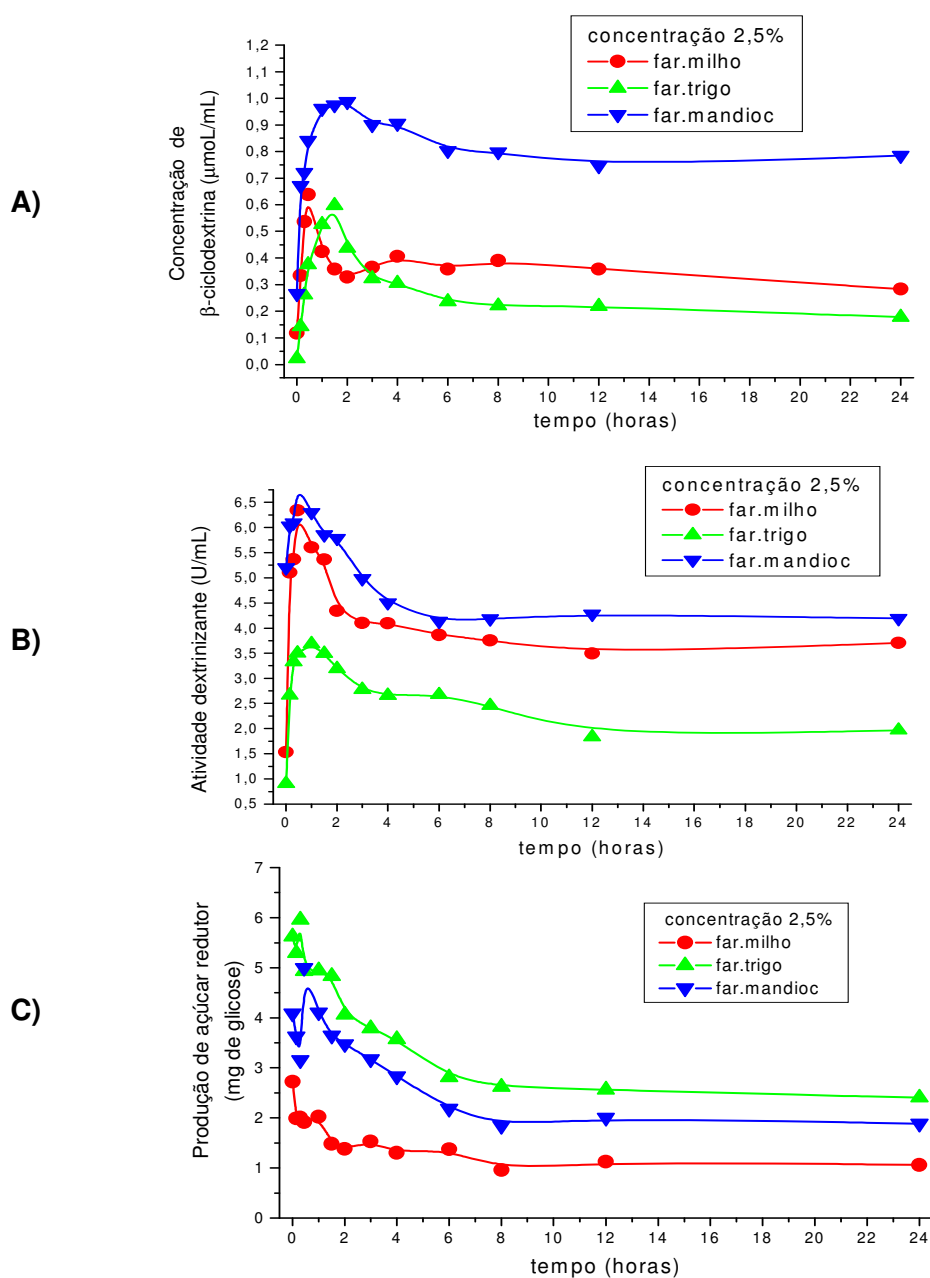
a: concentração de substrato 2,5%; b: concentração de substrato 5%. Tempo de ação enzimática: 24h.

Os dados obtidos em relação ao tipo preferencial de CD formada, no estudo tendo como substratos farinhas e farelos, apresentou a produção preferencial de  $\beta$ -CD nestes substratos pela ação a CGTase proveniente do *Bacillus clausii* E16.

Estes resultados corroboraram o potencial enzimático da CGTase do *Bacillus clausii* E16 para uso industrial como produtora específica de  $\beta$ -CDs, o perfil da enzima, com relação a produção da  $\beta$ -CD, sua capacidade dextrinizante e de formação de açúcar redutor (figuras 2 e 3), foi estudado tendo como substratos farinhas de mandioca, milho e trigo e os farelos de mandioca e trigo.

Os dados da atividade dextrinizante (figura 2B e 3B) para as farinhas apontou a farinha de mandioca como a de melhor atividade. Para os farelos, o de mandioca, foi o que apresentou atividade dextrinizante significativa. Em ambos os estudos, a maior parte do amido presente nas farinhas e nos farelos, foi hidrolisado nas primeiras horas de reação, o que também ocorreu com a produção de CDs medida pelo método CD-Fenolftaleína. Observou-se ainda, que após 8h de reação os dados se mantiveram constantes, tanto para farinhas, quanto para farelos, indicando provavelmente a associação de diminuição de atividade enzimática e a escassez de substrato.

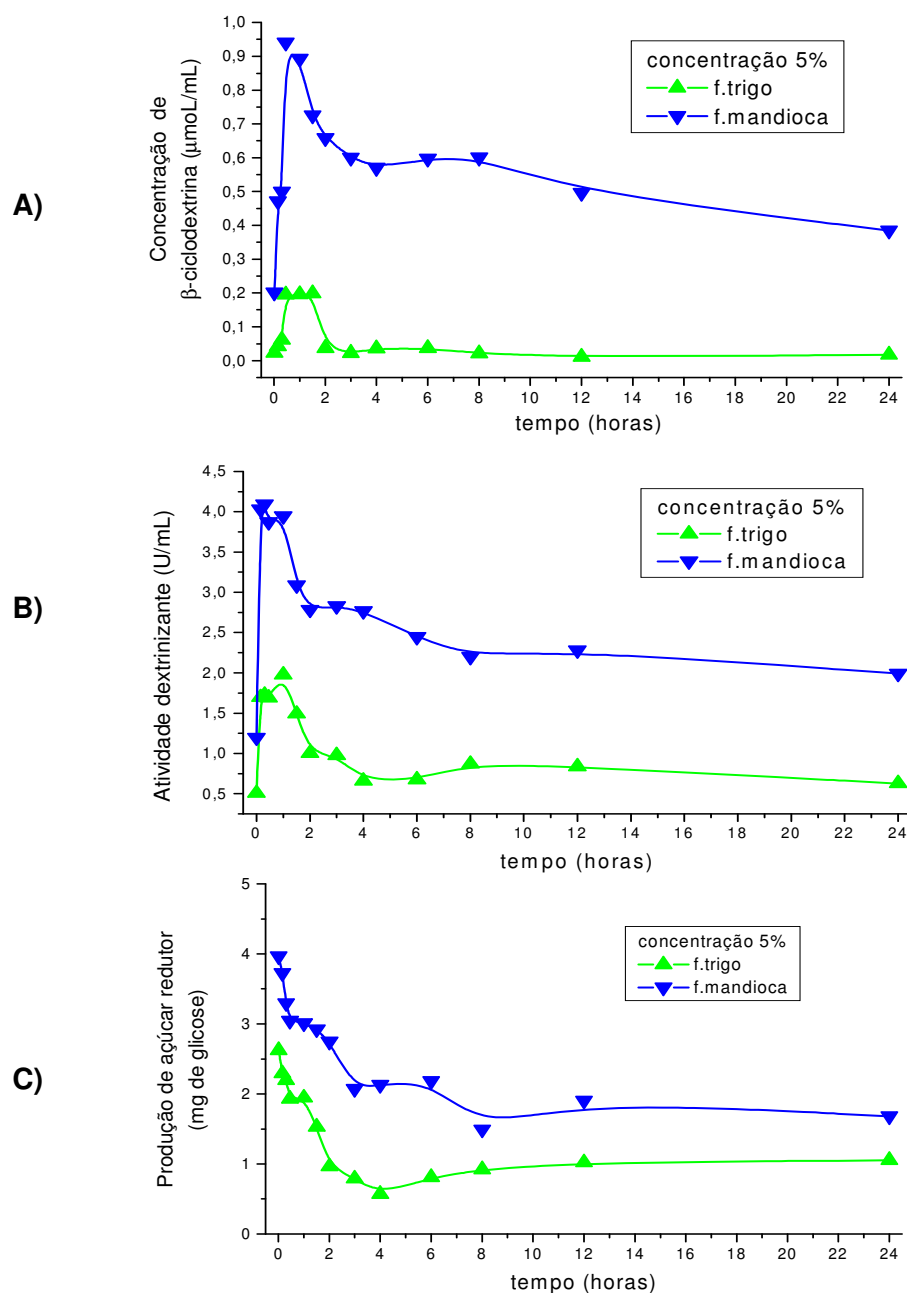
A produção de extremidades redutoras na farinha de milho e no farelo de trigo (figura 2C e 3C) foram menores do que as apresentadas para a farinha de mandioca e o farelo de mandioca, devido a uma maior eficiência enzimática de enzimas amilolíticas em amido de mandioca (RICKARD et al, 1991; FRANCO et al, 2001).



**Figura 2:** Perfil da CGTase do *Bacillus clausii* E16 em diferentes tipos de farinhas com relação a: **A)** produção de  $\beta$ -CDs; **B)** capacidade dextrinizante e **C)** formação de açúcar redutor (Substratos a 2,5%).

A exceção ocorreu com a farinha de trigo, que apresentou valores de extremidades redutoras maiores que as outras farinhas, mas esse fato pode ser explicado, se considerarmos que farinhas de trigo comerciais, geralmente, tem seu teor de glicose aumentado com o uso de enzimas amilolíticas, o que implicaria em um alto teor de extremidades redutoras já presentes no substrato, o que pode ser

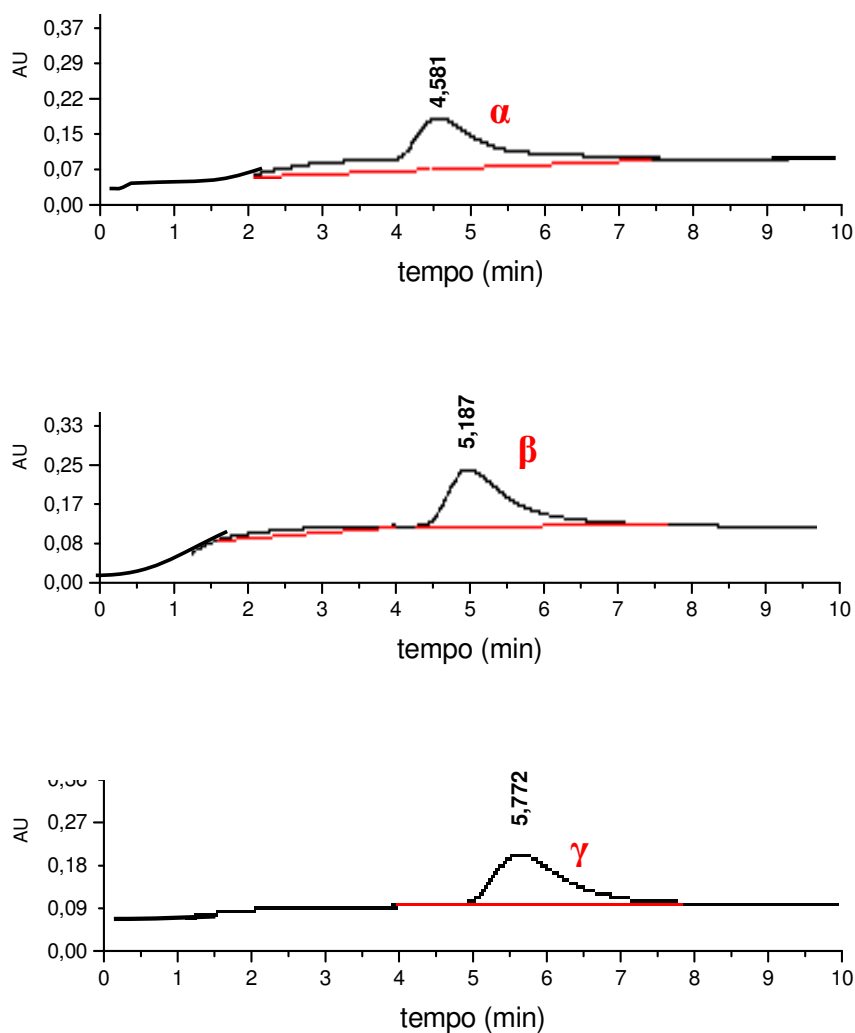
verificado na fase inicial da reação para este substrato (figura 2C). Em todos os substratos estudados, a produção de extremidades redutoras ocorreu nas primeiras horas de reação, seguido de uma queda acentuada, estabilizando-se após 8 horas. A queda na produção de extremidades redutoras pode ser atribuída a maior atividade de ciclização da CGTase nas primeiras horas de reação como também a perda de atividade enzimática durante a reação.



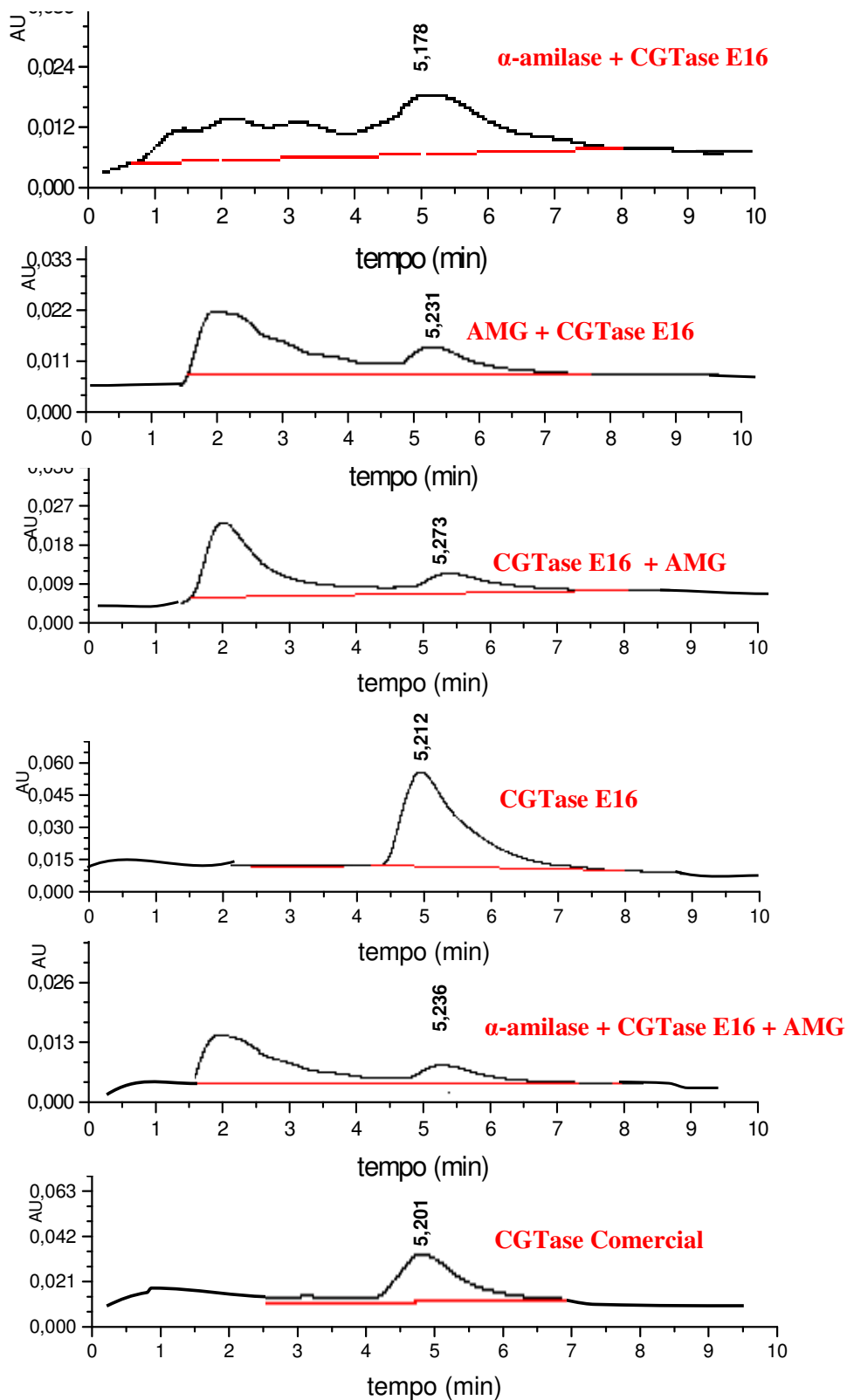
**Figura 3:** Perfil da CGTase do *Bacillus clausii* E16 em farelos com relação a: **A)** produção de  $\beta$ -CDs; **B)** capacidade dextrinizante e **C)** formação de açúcar redutor. (Substratos a 5%).

### Produção de CDs em farelo de mandioca em diferentes tratamentos enzimáticos

Esse experimento foi realizado com o intuito de se obter as melhores condições de produção de CDs em farelo de mandioca com a enzima CGTase proveniente do *Bacillus clausii* E16. Para isso foram utilizadas soluções enzimáticas comumente empregadas industrialmente na produção de CDs e comparadas com a atuação da enzima CGTase E16 sozinha. O perfil cromatográfico deste experimento está apresentado nas figuras 4 e 5. Os dados de conversão em CDs da atuação da enzima CGTase E16 em associação com outras enzimas ou sozinha estão apresentados na tabela 2.



**Figura 4:** Perfil cromatográfico em função do tempo (min.) dos padrões  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CDs, (concentração dos padrões: 20mg/mL).



**Figura 5:** Perfil cromatográfico em função do tempo (min.) do farelo de mandioca (5%) após 2h da ação da CGTase do *Bacillus clausii* E16 com e sem pré tratamentos enzimáticos e da ação da enzima CGTase comercial. (Os picos com os tempos marcados apresentaram tempo de retenção semelhantes ao do padrão  $\beta$ -CD).

**Tabela 2:** Produção de CDs em farelo de mandioca pela CGTase do *Bacillus clausii* E16 com e sem tratamento enzimático em CLAE.

Enzima	Produção de CDs (mg/mL)				Conversão (%)
	alfa	Beta	gama	total	
$\alpha$ -amilase + CGTase E16 <sup>a</sup>	0	10,88 $\pm$ 0,13	0	10,88	21,76%
CGTase E16 <sup>a</sup>	0	20,24 $\pm$ 0,20	0	20,24	40,48%
AMG + CGTase E16 <sup>a</sup>	0	7,13 $\pm$ 0,08	0	7,13	14,26%
CGTase E16 + AMG <sup>a</sup>	0	8,34 $\pm$ 0,17	0	8,34	16,68%
$\alpha$ -amilase + AMG + CGTase E16 <sup>a</sup>	0	5,66 $\pm$ 0,31	0	5,66	11,32%
CGTase Comercial (controle) <sup>a</sup>	0	14,47 $\pm$ 0,21	0	14,47	28,94%

a: substrato farelo de mandioca 5%. Tempo de reação da enzima CGTase:2h.

A melhor taxa de conversão do farelo de mandioca em CDs foi obtida pela enzima CGTase E16 sem pré tratamentos enzimáticos, que converteu 40,48% (p/p) em  $\beta$ -CD, sendo essa taxa maior que a atingida pela enzima comercial, que foi de 28,94% (p/p) em  $\beta$ -CD. Os pré tratamentos enzimáticos mostram-se desnecessários para a produção de ciclodextrinas utilizando a CGTase E16.

A produção de CDs em farelo de mandioca pela CGTase E16, mostrou-se muito significativa e atingiu taxas de conversão próximas as encontradas para algumas CGTases em amido na literatura. Pongsawasdi & Yagisawa (1988) estudaram a CGTase produzida por *Bacillus circulans* C31 e observaram que esta enzima, utilizando-se de amido solúvel 5% (p/v) como substrato, obteve uma taxa de conversão de 28% em  $\beta$ -CDs. A enzima CGTase do *Bacillus megaterium* em estudo de Pishtiyski & Zhekova (2006) produziu ciclodextrinas em vários tipos de amidos obtendo uma produção de 50,9% de ciclodextrinas em amido de milho.

Poucos estudos utilizam resíduos agroindustriais como o farelo de mandioca como substrato para ciclodextrinas. O estudo do uso de fontes alternativas como substrato na produção de produtos que tenham alto valor agregado se justifica, devido principalmente, no caso dos farelos, a estes serem um problema para as indústrias e ambiental. No caso do farelo de mandioca, este é um resíduo que se apresenta como um grande problema para as fecularias. A característica principal do farelo de mandioca é de conter elevado teor de amido residual. Na extração, cerca de 3% de amido residual fica retido em menos de 3% de fibra, que absorve grandes quantidades de água, o que explica porque praticamente cada tonelada de raiz equivale a uma tonelada de farelo úmido. A elevada quantidade de farelo gerado e a

sua umidade fazem que este material se apresente como um problema devido a dificuldade de armazenamento e transporte (LEONEL, 2001a).

Cereda (1996) em seu trabalho afirma que a composição média do farelo de mandioca é: 75% de amido, 15% de fibras, 1,6% de cinzas, 2% de proteínas, 1% de açúcares e 0,8% de matéria graxa expressos na base seca. Os teores de pH e acidez são bastante variáveis devido as fermentações naturais do resíduo úmido.

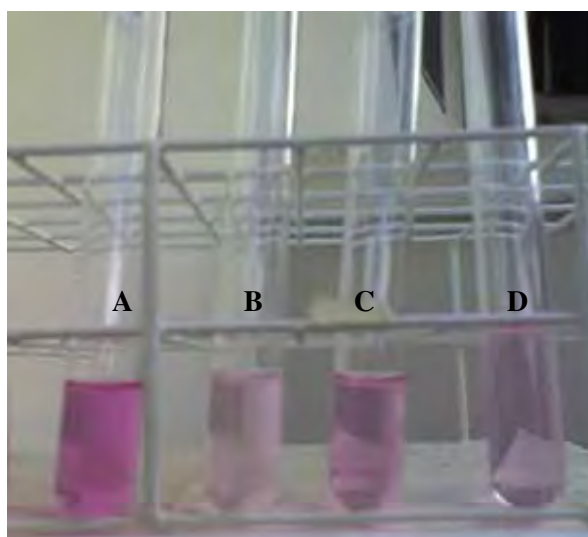
O amido residual do farelo não é acessível por métodos físicos, mas pode se mobilizado por enzimas. A hidrólise enzimática do farelo vem sendo estudada utilizando-se a enzima  $\alpha$ -amilase, o que resulta em um produto fibroso levemente açucarado devido hidrólise parcial, ou então total, produzindo um hidrolisado com elevado teor de glicose e um produto rico em fibras "solúveis". O hidrolisado também pode ser fermentado e comercializado como álcool fino, gerando-se ainda a vinhaça que pode ser vendida para a alimentação animal (CEREDA, 1996). Ainda são escassos os estudos realizados utilizando outras enzimas amilolíticas na hidrólise deste farelo.

Segundo Leonel (2001b), o aproveitamento dos resíduos em processos industriais tem sido um dos principais parâmetros de avaliação no que concerne a introdução de uma nova linha de produção. Para as indústrias, se faz necessário avaliar não somente os custos do processo e do produto, mas também caracterizar os seus resíduos, de forma a se estabelecer quais as possibilidades destes se tornarem co-produtos do processo, o que possibilitaria as indústrias processadoras de mandioca novas fontes de renda e, conseqüentemente, a redução no impacto ambiental destes resíduos.

### **Produção de CDs e secagem em spray dryer**

Foram utilizados os melhores resultados encontrados no experimento anterior da ação da enzima da CGTase obtida do *Bacillus clausii* E16 sobre o resíduo farelo de mandioca na concentração de 5% (p/v) na produção de ciclodextrinas. Os experimentos realizados de produção de CDs tendo o farelo de mandioca como substrato, utilizaram a ação enzimática da CGTase E16 sozinha, a da enzima com o pré-tratamento da enzima  $\alpha$ -amilase e comparada com a ação da CGTase comercial.

Após a ação enzimática sobre o farelo, a mistura foi seca em spray dryer. O pó contendo as ciclodextrinas produzidas foi quantificado pelo método CD-fenolftaleína e foi constatada a produção de CDs (figura 6), sendo a produção da CGTase E16 sozinha (sem pré-tratamento) a que obteve o melhor resultado, na ordem de 36,56g por 100g de substrato. Já para enzima com o pré-tratamento a quantidade de  $\beta$ -CDs encontrada foi da ordem de 23,92g por 100g de substrato e para a enzima comercial foi de 32,72g por 100g de substrato. Os resultados apresentados pelo método CD-fenolftaleína foram próximos aos encontrados no experimento anterior em CLAE (tabela 3).



**Figura 6:** Método CD-fenolftaleína: (A) reação controle, (B) reação CGTase E16; (C) reação CGTase E16 +  $\alpha$ -amilase; (D) reação da enzima comercial. A coloração mais clara indica a maior presença de  $\beta$ -CD.

**Tabela 3:** Produção de CDs em farelo de mandioca pela CGTase do *Bacillus clausii* E16 com e sem tratamento enzimático pelo método CD-fenolftaleína.

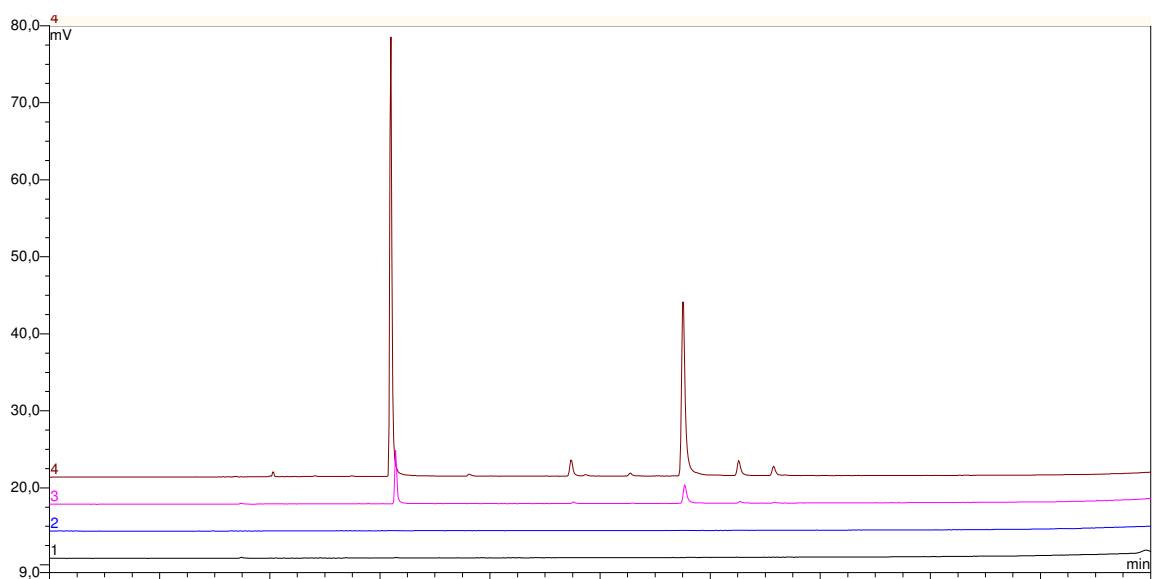
Enzima	Produção de CDs (mg/mL)
	(metodo CD-fenolftaleína)
	Beta
$\alpha$ -amilase + CGTase E16	11,96
CGTase E16	18,28
CGTase Comercial	16,36

### Encapsulação de aroma de limão em CDs produzidas em farelo de mandioca

Na tentativa de determinar o potencial das ciclodextrinas presentes na mistura proveniente da produção em farelo de mandioca, foi realizado um experimento de encapsulação do aroma de limão com as ciclodextrinas produzidas. Foi utilizada as ciclodextrinas provenientes do ensaio com a CGTase E16 sem pré-tratamento, pois esta gerou os melhores rendimentos.

Foram analisadas por “Headspace” em cromatografia gasosa, as amostras contendo aroma de limão, ciclodextrina/aroma de limão encapsulado, sílica/aroma de limão e ciclodextrina de farelo de mandioca pura. Após o aquecimento das amostras, podemos notar que o perfil da amostra de ciclodextrina produzida em farelo de mandioca e submetida a encapsulação com o aroma de limão mostrou um perfil cromatográfico semelhante ao aroma de limão puro, apresentando o pico característico deste aroma (figura 7).

Para excluirmos a possibilidade de aroma adsorvido na superfície, a sílica foi utilizada e sofreu os mesmos procedimentos de encapsulação e secagem da amostra com ciclodextrina e o aroma de limão encapsulado, e pudemos observar que o perfil cromatográfico da sílica e da ciclodextrina pura, diferiu do aroma e da ciclodextrina/aroma encapsulado, não apresentando o pico comum ao aroma de limão (figuras 7).



**Figura 7:** Perfis Cromatográficos. (—) amostra de ciclodextrina pura; (—) amostra de sílica/aroma de limão; (—) amostra de ciclodextrina/aroma de limão encapsulado ; (—) amostra de aroma de limão puro.

Estes perfis nos deram indícios claros que as ciclodextrinas produzidas em farelo de mandioca e submetidas a encapsulação com aroma, foram capazes de uma provável inclusão do aroma com estas ciclodextrinas. Estudos mais conclusivos, neste sentido, deverão ser continuados posteriormente a estes trabalho.

## **CONCLUSÕES**

Neste estudo observou-se que a enzima produziu preferencialmente  $\beta$ -CD nos diferentes tipos de substrato utilizados (farelo de trigo e de mandioca; farinha de trigo, de mandioca e milho; amido solúvel, de milho, de trigo e de mandioca).

O substrato farelo de mandioca mostrou-se como fonte viável para a produção de  $\beta$ -CD. O grau de conversão, utilizando-se o farelo de mandioca, foi de 40,48% (p/p) em  $\beta$ -CD. Estudos preliminares apontaram a complexação do flavor com as ciclodextrinas produzidas neste substrato.

Os dados de produção obtidos com o farelo de mandioca, mostraram-se interessantes para a produção de  $\beta$ -CD, pois este resíduo agroindustrial apresenta alto teor de amido em sua composição (75%) e um custo consideravelmente menor em relação aos amidos, sendo facilmente acessível durante todo o ano, e ainda, podendo promover uma redução no impacto ambiental.

## REFERÊNCIAS

- ABAM. Associação brasileira de produtores de amido de mandioca, 2008 <http://www.abam.com.br>, acessado em 02/09/2008.
- AGUIAR, C. L. Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 19, n 1, p. 119-138, 2001.
- ALLEGRE, M. and DERATANI, A. Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality. *Agroo Food Industry Hi Tech*. p. 9-17, January/February, 1994.
- ALVES PRADO, H. F. Estudo da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus* sp alcalofílico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 2000, p.188.
- ALVES PRADO, H. F.; HILÁRIO, E.; GOMES, E. and DA SILVA, R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. Anais da XIII Simpósio Nacional de Fermentações (XIII-SINAFERM), FB48/CD, Teresópolis, RJ, 07 a 10 agosto de 2000.
- BHANDARI, R., D'ARCY, B. R., BICH, L. L. T. Lemon oil to  $\beta$ -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of  $\beta$ -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *J. Agric. Food Chem.* v.46, p. 1494-1499, 1998.
- BENDER, H. Production, Characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*. v.6, p. 31-71, 1986.
- BERTOLINI, A.C., CEREDA, M.P., CHUZEL, G. Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*. v.18 (2), p. 224-229, 1998.
- CEREDA, M. P. (Coord.) *Propriedades gerais do amido*. Campinas: Fundação Cargill, 2001. 224p. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v.1)
- CUCOLO, G.R. Produção e caracterização da CGTase de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e aplicação da enzima em produtos de panificação. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, 2004, p.127.

- FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. Recent advances in microbial amylases. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Londres: Elsevier Applied Science, 1990. cap. 3, p. 711-32.
- FRANCO, C.M.L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L.J.C.B.; LEONEL, M.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O. and SARMENTO, S.B.S. Propriedades gerais do amido. In: *Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas V1*. CEREDA, M.P. (coord.). São Paulo: Fundação Cargill, 2001. p.224.
- FUWA, H. A new method for micro determination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. *J. Biochem.* v. 41, p. 583-603, 1954
- HAMILTON, L.M., KELLY, C.T., FOGARTY, W.M. REVIEW: CYCLODEXTRINS AND THEIR INTERACTION WITH AMYLOLYTIC ENZYMES. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p.561-567, 2000.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A L. and RANDAL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-75, 1951.
- LEONEL, M. O farelo, subproduto da extração de fécula de mandioca. In: *Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas v4*. São Paulo: Fundação Cargill, 2001a. p. 211-217.
- LEONEL, M. Caracterização da fibra e uso do farelo de mandioca como base para produtos dietéticos. In: *Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas v4*. São Paulo: Fundação Cargill, 2001b. p. 221-229.
- MÄKELÄ, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO, J. and LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. *Journal Agric. Food Chem.* v. 36, p. 83-88, 1988.
- MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; GUIMARÃES, M. F. and MORAES, F. F. Enhancement of selectivity for producing  $\gamma$ -cyclodextrin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.84-86, p.955-962, 2000.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-8, 1959.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*. v.74, p.81-87, 2000.

- PISHTIYSKI, I. AND ZHEKOVA, B. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v22, p. 109-114, 2006.
- PONGSAWASDI, P., YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. *Journal Fermentation Technology*. v.65, n.4, p. 463-467, 1987.
- PONGSAWASDI, P. AND YAGISAWA, M. Purification and some properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. *Agricultural and Biological Chemistry* v.52, n.5, p. 1099-1103, 1988
- PSZCZOLA, D. E. Production and potential food applications of cyclodextrins. *Food Technology*. January, p.96-100, 1988.
- QI, Q. & ZIMMERMANN, W. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.66, p. 475–485, 2005.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Journal of Biotechnology*. v.1,n.3, p.174-188,1998.
- RAJA, K. C. M.; SREEDHARAN, V. P.; PREMA, P.; RAMAKRISHNA, S. V. Cyclodextrin from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch. Isolation and characterization as bromobenzene and chloroform chathrates. *Starch*, v.42 (5), p.196-198, 1990.
- 359, 1992.
- RENDLEMAN JR., J. A. Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem*. v. 26, p. 51-61, 1997.
- RICKARD, J. E.; ASAOKA, M. AND BLANSHARD, J. M. V.** The physicochemical properties of cassava starch. *Tropical Science*, v. 31, n. 22, p. 189-207, 1991.
- SIAN, H., SAID, M., HASSAN, O., KAMARUDDIN, K., ISMAIL, A., RAHMAN, R., MAHMOOD, N. & ILLIAS, R. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1101–1111, 2005.
- SABIONI, J. G. Uma molécula de muitas possibilidades. *Ciência Hoje*, v. 18, n. 102, p. 1415, 1994.
- SINGH, M., SHARMA, R., BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrin. *Biotechnology Advances*, v.20, p.341-359, 2002.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin in food, cosmetic and toiletries. *Starch/Stärke*. v.34, n.11, p.379-385, 1982.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin in Pesticides. *Starch/Stärke*. v.37, n.11, p.382-386, 1985

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

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

YANG, X., CHEN, H., GAO, H., LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v.78, p.277-280, 2001.

YU, E. K. C.; AOKI, H. and MISAWA, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied Microbiol Biotechnol.* v.28, p. 377-379, 1988.