
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Giovana Beatrice Alves de Souza

**PRODUÇÃO DE β -CICLODEXTRINA PELA
ENZIMA CICLODEXTRINA-
GLICOSILTRANSFERASE POR *Bacillus*
lehensis E APLICAÇÃO PARA INCLUSÃO
DE RAMNOLIPÍDEOS**

Rio Claro
2021

GIOVANA BEATRICE ALVES DE SOUZA

PRODUÇÃO DE B-CICLODEXTRINA PELA ENZIMA
CICLODEXTRINAGLICOSILTRANSFERASE POR *Bacillus lehensis* E
APLICAÇÃO PARA INCLUSÃO DE RAMNOLIPÍDEOS

Orientador: Prof Dr. Jonas Contiero

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro,
para obtenção do grau de Bacharela e
Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2021

S729p

Souza, Giovana Beatrice Alves

Produção de β -ciclodextrina pela enzima
Ciclodextrinaglicosiltransferase por *Bacillus lehensis* e
aplicação para inclusão de ramnolipídeos / Giovana Beatrice
Alves Souza. -- Rio Claro, 2021
26 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura -
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero

1. Ciclodextrina. 2. Complexo de inclusão. 3. Biossurfactante.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Dedico esse trabalho aos meus pais. Ao meu pai que se tornou um anjo, mas deixou um ensinamento de agradecer e viver a vida de maneira simples e feliz e por nunca deixar de lutar pelos próprios sonhos. E a minha mãe, que me apoiou e me fortaleceu nos momentos difíceis, símbolo de amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Para iniciar os agradecimentos, é necessário que eu escreva sobre três grandes sentimentos que permeiam a minha trajetória: O tempo, a morte e o amor.

Costumamos reclamar do tempo, em como ele passa rápido demais ou devagar, vivemos sem perceber que esse tempo que temos é o suficiente para realizarmos todos os sonhos e conquistas que quisermos. Achamos que o tempo é nosso inimigo, pelo contrário ele é nosso amigo, e no tempo necessário, ele cura, concretiza e realiza. Sou grata pelo tempo que tive para a minha formação e concretização desse sonho.

A morte, muitos de nós não gosta falar ou mencionar tal acontecimento, eu já fui uma dessas pessoas, mas a partir do momento que entendemos que faz parte do nosso ciclo, começamos a valorizar a vida. Obrigada Deus, por me permitir percorrer essa caminhada de seis anos.

O amor, é a maior parte de nós. Amor é fortaleza. Amor é preenchimento. E foi por amor que eu continuei e lutei para alcançar esse sonho.

Sou grata aos meus pais, que me mostraram a existência de Deus desde quando eu era menina. Obrigada Deus por se mostrar presente em tantos momentos em que pensei estar sozinha.

Agradeço do fundo do meu coração aos meus pais que me ensinaram muito sobre gratidão e humildade.

Ao meu falecido pai Gianpaul que esteve comigo durante essa jornada me incentivando, me levando e buscando da faculdade, sempre se preocupando comigo. Me lembro do primeiro dia de matrícula em que você assinou a minha entrada. Hoje o seu amor vive dentro de mim, obrigada por tanto.

À minha mãe Denise que é exemplo de mulher forte e independente, em quem me inspiro um dia me tornar pelo menos metade da pessoa incrível que é. Obrigada pela força, pelo amor e pelo suporte.

As minhas irmãs Larissa e Letícia e meu cachorrinho Dominick que foram essenciais durante esses anos me trazendo alegria em momentos difíceis e me dando ombro amigo em todas as situações.

Aos meus amigos de faculdade Giulia, Aline, Júlia, João Pedro e Amanda que sempre me incentivaram a continuar e fizeram toda essa jornada ser muito mais incrível, engraçada e leve.

Ao laboratório de Microbiologia e Bioquímica em que realizei minha pesquisa, obtendo muita ajuda de colegas de graduação, mestrandos e doutorandos.

Ao meu orientador Jonas Contiero que me auxiliou durante a minha pesquisa e sempre me incentivou a correr atrás de novos projetos. Em inúmeros intervalos, onde conseguimos tomar um café e conversar sobre a vida, ele me mostrou o significado da palavra força de vontade. Agradeço também à CNPq, que apoiou a realização do presente trabalho.

RESUMO

As ciclodextrinas são formadas a partir da degradação de amido pela enzima ciclodextrina- glisiltransferase, a qual é produzida por microrganismos. As ciclodextrinas são compostas por oligossacarídeos cíclicos e originam a α -CDS, β -CDs e γ -CDs. A β - ciclodextrina possui maior aplicação industrial, como no setor alimentício, farmacêutico e em cosméticos. As ciclodextrinas possuem uma importante propriedade que é a formação do complexo de inclusão. Esse complexo de inclusão é desenvolvido a partir das características estruturais da ciclodextrina, denominada de tronco-cônica que compreende uma parte interna hidrofóbica e uma externa hidrofílica, ocorrendo assim a complexação com várias moléculas. Os complexos de inclusão podem ser classificados em completo, parcial, axial, "sandwich" e estequiometria superior. Dessa maneira, a partir do processo de formação da ciclodextrina, foi realizada a complexação com o biossurfactante. Os biossurfactantes atuam na redução superficial e interfacial, assim são bastante utilizados na biorremediação de ambientes poluídos por petróleo, produção de medicamentos e cosméticos. Os biossurfactantes são produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. O ramnolípídeo é um biossurfactante produzido a partir de *Pseudomonas aeruginosa*, e é composto por monoramnolípídeo, que contém uma ramnose em sua estrutura química e por diramnolípídeo, que possui duas ramnoses em sua estrutura química. O presente trabalho tem por finalidade o estudo da complexação do ramnolípídeo com a β -ciclodextrina com o intuito de verificar a preferência da molécula de β -ciclodextrina em relação aos homólogos mono e diramnolípídeo e estabelecer um processo de separação.

Palavras-chave: Ciclodextrina. Complexo de inclusão. Biossurfactante.

ABSTRACT

Cyclodextrins are formed from starch hydrolysis by the enzyme cyclodextrin-glucosyltransferase, which is produced by microorganisms. Cyclodextrins are composed of cyclic oligosaccharides originating α -CDs, β -CDs and γ -CDs. β -cyclodextrin has greater industrial application, as in the food, pharmaceutical and cosmetics sectors. Cyclodextrins have an important property which is the formation of the inclusion complex. This inclusion complex is developed from the structural characteristics of cyclodextrin, called the conical trunk that comprises a hydrophobic internal part and a hydrophilic external part, thus occurring the complexation with several molecules. Inclusion complexes can be classified into complete, partial, axial, sandwich, and superior stoichiometry. Thus, from the process of formation of cyclodextrin, the biosurfactant was complexed. Biosurfactants act in superficial and interfacial reduction, thus they are widely used in bioremediation of oil polluted environments, production of medicines and cosmetics. These biosurfactants are produced by bacteria, yeast and filamentous fungi. Rhamnolipid is a biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa*, and is composed of monorhamnolipid, which contains a rhamnose in its chemical structure and dirhamnolipid, which has two rhamnoses in its chemical structure. The present work aims to study the rhamnolipid complexation with β -cyclodextrin in order to verify the preference of the β -cyclodextrin molecule over mono and dirhamnolipid homologues and to establish a separation process.

Keywords: Cyclodextrin. Inclusion complex. Biosurfactant.

SUMÁRIO

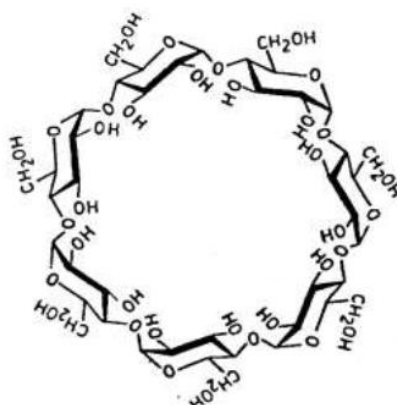
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Justificativa.....	11
1.2 Objetivos	11
1.3 Objetivos específicos.....	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 Microrganismo.....	12
2.2 Meio de estoque do microrganismo	12
2.3 Meio seletivo do microrganismo.....	12
2.4 Preparação do inóculo e ativação do microrganismo	13
2.5 Confeção da curva padrão de β-CD.....	13
2.6 Processo Fermentativo.....	14
2.7 Obtenção de complexos de inclusão da ciclodextrina com ramnolipídeo ..	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 Curva de crescimento	17
3.2 Cálculo da atividade enzimática.....	18
3.3 Formação do Complexo de inclusão	21
4 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

Há um grande destaque na área de Biotecnologia abrangendo a produção de enzimas através de microrganismos. O foco desse estudo é a produção da enzima ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus lehensis* (BLANCO et al., 2012, Blanco et al., 2014).

A CGTase catalisa a reação da formação de ciclodextrinas (CDs) a partir do amido (CUCOLO et al., 2006; BLANCO et al., 2015). As CDs são compostas por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4, formando uma estrutura tronco-cônica (Figura 1), que permitem a formação de complexo de inclusão com moléculas hóspedes. As principais estruturas das CDs são α -CDS, β -CDs e γ -CDs, formadas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente (SZEJTLI,1998).

Figura 1. Estrutura da Ciclodextrina.



Fonte: SZEJTLI,1998.

Assim, existe a produção de diferentes CDs, formadas a partir de distintas CGTases (MATIOLI et al., 2000). Dessa forma, ocorrem diversos processos na produção da enzima, aumentando sua área de interesse (BLANCO et al., 2017).

As ciclodextrinas possuem uma propriedade de grande relevância que é a formação de complexos de inclusão. Esses complexos de inclusão são produzidos a partir de características hidrofóbicas na parte interna (apolar) e hidrofílicas em sua parte externa, permitindo assim a complexação com várias moléculas. Esses complexos são chamados de hospedeiro – hóspede, e a ligação de moléculas (hóspedes) que ocorrem dentro da ciclodextrina (hospedeiro) é feita através de um equilíbrio. Essa propriedade atua em muitas aplicações, modificando ou melhorando características físico-químico das moléculas denominadas “hóspedes”, como a

solubilidade, estabilidade, proteção contra oxidação, isolamento físico de compostos incompatíveis, biodisponibilidade, isomerização (DEL VALLE,2004; HEDGES,1998).

Existem algumas classificações quanto aos complexos de inclusão: a completa, caracterizada pela molécula hóspede ser de tamanho pequeno, entrando assim totalmente na cavidade da ciclodextrina; a parcial, na qual a molécula entra apenas parcialmente na cavidade da ciclodextrina; a axial, na qual a molécula hóspede tem tamanho alongado e estreito entrando no eixo mediano da ciclodextrina; a “sandwich”, onde a molécula hóspede é grande e precisa de duas moléculas de ciclodextrina pra formar o complexo completo; e de estequiometria superior, em que duas moléculas hóspedes interagem com uma ciclodextrina ou duas moléculas hóspedes para duas ciclodextrinas (WENZ, 1994).

Existem muitas alternativas para a utilização das ciclodextrinas na produção de vários setores industriais. No setor alimentício, as ciclodextrinas agem na proteção contra oxidação de lipídios, assim como na estabilidade de aromas (SZENTE et al, 2004); no farmacêutico contribui para o aumento da solubilidade de fármacos devido a sua formação de complexos de inclusão, assim como a liberação lenta do princípio ativo (RAJEWSKI et al,1996); em cosméticos elimina ou reduz odores (CENTINI et al, 2007); Na despoluição ambiental age como proteção à resíduos tóxicos industriais, atuando na formação de complexos não tóxicos e na parte química como catalisadores e auxiliando em extrações de misturas (SALPIRA et al, 2006; SASIKALA et al, 2009).

Além do foco da produção da β -ciclodextrina, faz parte desse estudo a complexação dessa molécula com ramnolipídeo, o qual é um biossurfactante bastante utilizado atualmente.

Biossurfactantes são de origem bioquímica, pois são produzidos a partir de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Esses biossurfactantes tem notáveis características, como baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, dessa forma, atuam na redução de tensão superficial e interfacial (BANAT et al, 2000) São estudados no Laboratório de Microbiologia Industrial há muito tempo, logo são de grande valor para processos industriais, como na biorremediação de ambientes poluídos por petróleo, produção de medicamentos e cosméticos (MULLER et al, 2012). Nesse estudo em especial, será utilizado os ramnolipídeos que são produzidos a partir de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Na sua produção ocorre a presença de homólogos mono e diramnolipídeos, sendo que na estrutura química há uma ramnose e duas ramnoses,

respectivamente. Pretende-se através da complexação verificar a preferência da molécula de β -ciclodextrina em relação aos homólogos e estabelecer um processo de separação.

1.1 Justificativa

O presente projeto se justifica na grande possibilidade de aplicação das ciclodextrinas, principalmente nos setores industriais. Pesquisas de otimização da produção de CGTases que formam as ciclodextrinas de menor custo são de enorme importância, pois viabilizam economicamente o uso das ciclodextrinas em escala comercial. Além disso, o complexo da ciclodextrina com o ramnolípídeo é inovador, pois busca a separação dos homólogos que constituem o ramnolípídeo e desse modo, esses homólogos poderão ser utilizados em diversos processos que necessitam apenas do monoramnolípídeo ou do diramnolípídeo agregando valor, uma vez que a utilização de um homólogo tem sido muito estudada.

1.2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é estudar a produção da enzima CGTase por *Bacillus lehensis* utilizando amido como substrato. Após separação da enzima, fazer o uso dela para produção de β -ciclodextrina para uso no encapsulamento de ramnolípídeo.

1.3 Objetivos específicos

- Analisar o crescimento do micro-organismo em placas de *Petri* contendo meio seletivo;
- Verificar a capacidade de diversas concentrações da fonte de carbono como substrato para produção de enzima, utilizando o micro-organismo *Bacillus lehensis*;
- Determinar o crescimento celular do micro-organismo durante a produção da enzima CGTase;
- Utilização de parâmetros já determinados para produção de CGTase e produção de β -ciclodextrina.
- Estudar a possibilidade da complexação da β -ciclodextrina com a ramnolípídeo

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A enzima CGTase foi produzida a partir da linhagem da bactéria *Bacillus lehensis* que foi proveniente da Coleção de Cultura do Laboratório de Microbiologia Industrial do Instituto de Biociências de Rio Claro a qual foi isolada de água residuária de fecularia.

2.2 Meio de estoque do microrganismo

Para a ativação do microrganismo foi realizado repiques da cultura estoque. Nesse estoque a bactéria é mantida em criotubo contendo 50 % de meio de cultura de crescimento do microrganismo e 50 % de glicerol a 40 %. As culturas foram mantidas sob congelamento para diminuir o metabolismo celular até futuras necessidades de uso.

2.3 Meio seletivo do microrganismo

A composição do meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo *Bacillus lehensis* foi proposto por Nakamura e Horikoshi (1976).

Tabela 1. Composição do meio de cultura original utilizado para o crescimento do microrganismo *Bacillus lehensis*.

Componentes	Concentração (g/L)
Amido solúvel (comercial)	2,00
Polipectona	0,50
K ₂ HPO ₄	0,10
Na ₂ CO ₃	1,00
Extrato de levedura	0,50
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02

Fonte: Elaborado pela autora.

Para o meio empregado nos processos fermentativos para a produção de CGTase utilizou-se o meio descrito por Nakamura e Horikoshi (1976), porém ao invés de utilizar o componente Polipeptona, foi utilizado a Triptona.

2.4 Preparação do inóculo e ativação do microrganismo

Para realizar a curva de crescimento da bactéria foi efetuado experimento de crescimento utilizando o equipamento CGQ (Cell Growth Quantifier). Esse equipamento é formado por quatro componentes: uma placa sensora, um revestimento escuro para erlenmeyer, uma estação-base e *software* cgQuant. Através desse sistema foi confeccionada a curva utilizando-se 130 rpm, 37°C, frascos de erlenmeyers de 500 mL de volume total e 100 mL de volume útil de meio. Esse programa analisa a cinética de crescimento e quantificação celular através da densidade óptica, em comprimento de onda de 600 nm. (INFORS MT, 2019).

2.5 Confeção da curva padrão de β -CD

Para confecção da curva padrão da β -CD, foi produzida uma solução estoque de β -CD 0,5 mM, pesando-se 0,01419g de β -CD, 5,0 mL de tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,0) e completando o volume a 25 mL com água destilada. A partir da solução estoque de β -CD 0,5 mM foram realizadas sucessivas diluições com o tampão Tris-HCl, conforme tabela abaixo. As amostras foram submetidas ao método colorimétrico do complexo fenoltaleína-ciclodextrina, para a leitura da absorbância em 550 nm (BLANCO, 2009).

Tabela 2. Volume de β -CD e tampão Tris-HCl para a curva padrão de β -CD.

TUBO	Volume β -CD 0,5 mM (ml)	Volume Tris-HCl 0,05M pH 8,0 (ml)
1	0	1
2	0,1	0,9
3	0,2	0,8
4	0,3	0,7
5	0,4	0,6
6	0,5	0,5
7	0,6	0,4
8	0,7	0,3
9	0,8	0,2
10	0,9	0,1
11	1	0

Fonte: Elaborado pela autora.

2.6 Processo Fermentativo

O processo de fermentação ocorreu após a ativação do microrganismo. A temperatura foi de 35° C por 72 h a 150 rpm em “shaker”. Do pré inóculo, em que ocorreu o crescimento do *Bacillus lehensis* foram transferidos 10 % (v/v) para Erlenmeyer de capacidade de 300 mL contendo 100 mL do meio de cultura. Ao final de tempos de 24; 48 e 72 horas de fermentação foram retiradas amostras de cada erlenmeyer e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante livre de células foi utilizado para determinação da atividade enzimática (AE). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

A determinação da atividade enzimática foi realizada pelo método colorimétrico do complexo ciclodextrina-fenolftaleína, no qual ocorre em um reator termostaticado em uma temperatura mantida à 55° C. Primeiramente foi colocado 5mL de amido 1% [0,1 g de amido solúvel; 1,0 mL de solução de CaCl_2 (0,05M); 1,0 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,0) e o volume completado a 10 mL com água destilada] e também 5mL do caldo bruto (o qual contém a enzima). Em seguida, foram retiradas 0,5mL das amostras em tempos pré-determinados de 0; 3; 6; 9; 12 minutos

e inativadas à 100°C em água fervente durante cinco minutos e depois deixadas em banho em temperatura ambiente.

Para a análise da atividade enzimática da CGTase, foi adicionada aos 0,5mL de amostras inativadas os 2,5mL da solução de trabalho [0,5 mL de solução alcoólica de fenolftaleína (3 mM); 5,0 mL de tampão carbonato de sódio 0,6 M (pH 10,5), sendo o volume completado a 25 mL com água destilada em balão volumétrico]. A leitura ocorreu em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm (MAKELA et al., 1988).

Para a produção de ciclodextrina adicionou-se em um reator encamisado 35 mL do caldo e 35 mL de amido a 1%. Para o controle do pH em 8,0 a solução de amido foi preparada com tampão Tris-HCl 0,05M. O reator era mantido a temperatura de 55° através de um banho ultratermostático, sendo as amostras retiradas em 0, 4, 9, 22, 24, 30, 35 horas. Essas amostras (0,5 mL) eram acrescidas de 2,5L de solução de trabalho. Dessa forma, por meio da coloração de cada amostra foi possível verificar se houve a produção da ciclodextrina (BLANCO et al, 2014).

2.7 Obtenção de complexos de inclusão da ciclodextrina com ramnolipídeo

A formação do complexo de inclusão da ciclodextrina com o ramnolipídeo ocorreu por meio do método em solução aquosa. Esse método consiste na solubilização da ciclodextrina em meio aquoso e posterior adição do “hóspede” (composto ativo) em excesso – permanece em temperatura constante e sob agitação durante um tempo suficiente para ocorrer a encapsulação (RAJEWSKI; STELLA, 1996). Realizou-se a dissolução da ciclodextrina utilizando 10 mL de água e posteriormente adicionou-se 1,5 g de ramnolipídeo para cada concentração de ciclodextrina, sendo mantido em temperatura ambiente e agitação por 24 horas. O procedimento consistiu na adição de quantidades crescentes de β -CD (tabela 3) a um excesso de ramnolipídeo em solução aquosa. Após 24h de agitação, o material foi centrifugado e quantificado.

A quantificação dos homólogos (mono e diramnolipídeo) foi feito através do HPLC (*High performance liquid chromatography*). Além disso, analisou-se o ramnolipídeo residual que não foi complexado na fase aquosa por TLC (*Thin layer chromatography*).

Tabela 3. Quantidade em gramas de ciclodextrina em cada frasco.

Frasco	[β-CD]	Massa β-CD (g)
1	0	0
2	0,5	0,00567
3	1	0,01135
4	2	0,02270
5	3	0,03405
6	4	0,0454
7	5	0,05675
8	6	0,06810
9	8	0,0908
10	10	0,1135
11	12	0,1362
12	14	0,1589
13	16	0,1816

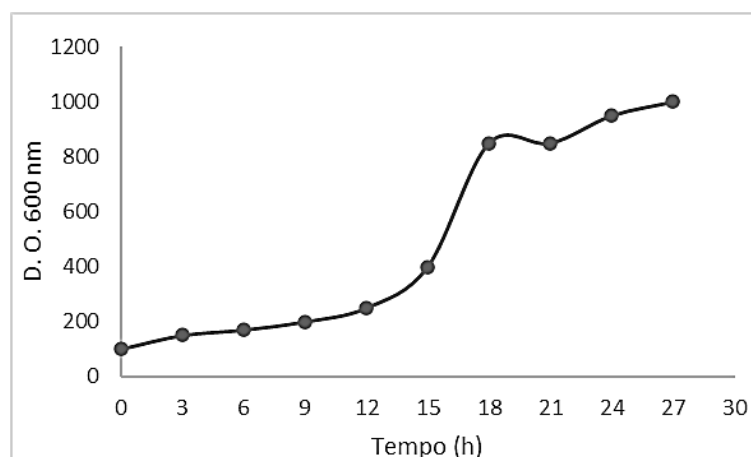
Fonte: Elaborado pela autora.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva de crescimento

A partir da utilização do programa CGQ, foi possível construir a curva de crescimento da bactéria *Bacillus lehensis* (Gráfico 1). Esse gráfico foi construído pela leitura da densidade óptica a 600nm da média dos meios de crescimento A e B em relação ao tempo. Nesse gráfico pode-se observar o crescimento do microrganismo no intervalo de 27 horas, evidenciando uma fase logarítmica (fase exponencial) mais acentuada no período de crescimento entre 15 e 18 horas.

Gráfico 1. Curva de crescimento *Bacillus lehensis*.



Fonte: Elaborado pela autora.

A formação de halos é uma forma mais rápida de detectar a atividade enzimática em nível de placa de Petri. Essa técnica tem como objetivo isolar e selecionar os microrganismos que produzem com maior seletividade altas concentrações de ciclodextrina (MATIOLI, 2000). Após 48h da inoculação do *Bacillus lehensis* foi possível observar a formação de halos (Figura 2).

Figura 2. Halos formados evidenciando a atividade enzimática do microrganismo



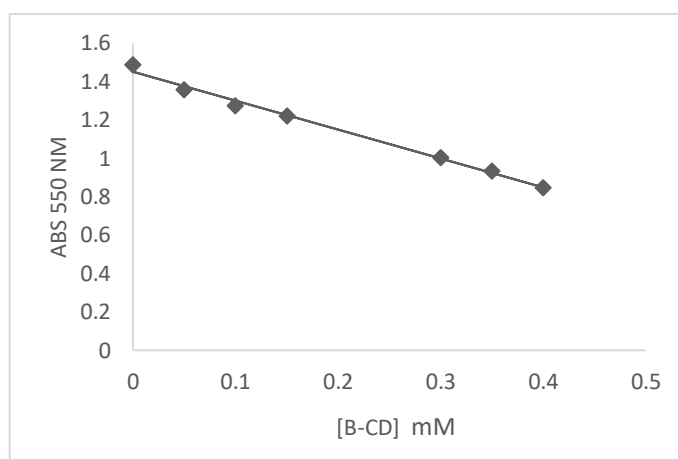
Fonte: Dados da pesquisa.

Segundo Mاتيoli (2000), a ciclodextrina formada pela enzima CGTase produzida pelo cultivo de cepas microbianas deste gênero é capaz de formar compostos de inclusão com a fenolftaleína, mudando a coloração do meio de cultura e formando halos de coloração amarela.

3.2 Cálculo da atividade enzimática

Para identificar o coeficiente angular utilizado posteriormente no cálculo da atividade enzimática, foi necessário realizar a confecção da curva padrão da β -ciclodextrina (Gráfico 2). Essa curva consiste em uma calibração do método, promovendo a correlação entre concentração de ciclodextrina e na sua complexação com a fenolftaleína tendo como fator de medida a absorbância. Experimentalmente obteve-se um coeficiente angular $\alpha = -1,5074$ e também um coeficiente de correlação igual a 0,992 comprovando a boa linearidade da reta padrão.

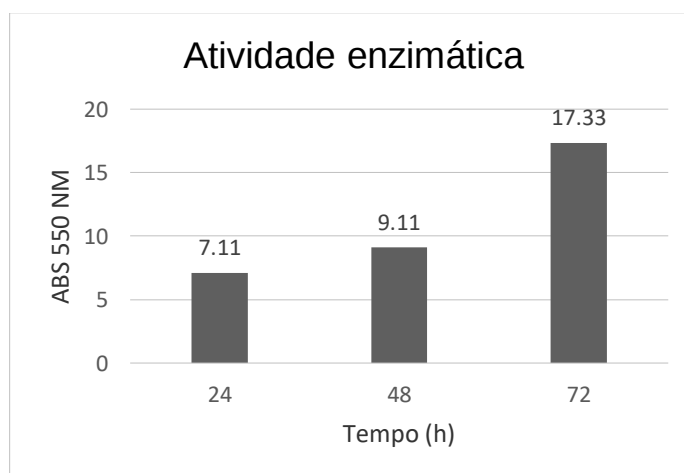
Gráfico 2. Reta padrão da concentração de β -ciclodextrina em 550 nm de absorbância.



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir do coeficiente angular obtido na reta padrão foi possível calcular a atividade enzimática. Durante uma fermentação foram retiradas amostras nos tempos de 24,48 e 72 horas. No gráfico 3, é demonstrado a atividade enzimática, a absorbância lida em 550nm em função do tempo de fermentação.

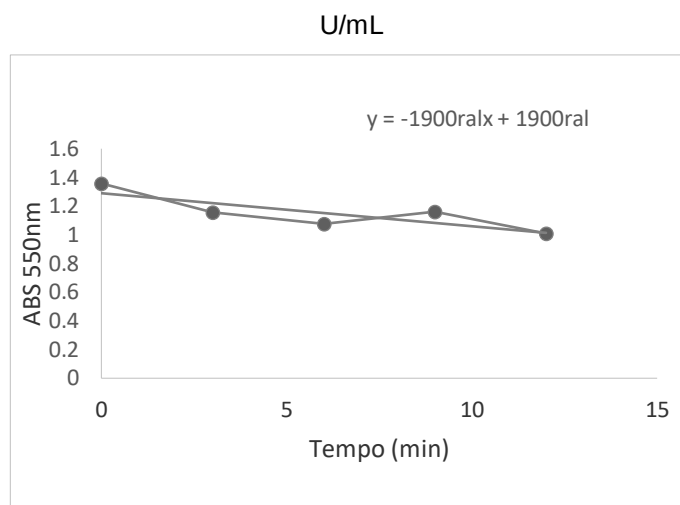
Gráfico 3. Atividade enzimática em diferentes tempos de fermentação.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para exemplificar o cálculo da atividade enzimática, usou-se maior valor, ocorrido no tempo de 72 horas (gráfico 3). O cálculo foi feito a partir do valor de 0,023 obtido a partir da inclinação da reta (gráfico 4). Dessa forma, para cada experimento foi encontrado uma inclinação diferente.

Gráfico 4. Inclinação e equação da reta no tempo de 72h. $AE = 1,5074 + 0,023 \cdot 1 \cdot 1000 \cdot 0,5 = 17,33$



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir desse experimento, foram realizadas fermentações em triplicatas com o intuito de aumentar a atividade enzimática. Abaixo segue a tabela 4 com o tempo de fermentação, suas atividades enzimáticas e a média das atividades enzimáticas. Observa-se que em 24 horas a atividade era maior do que em 48 e 72 horas.

Tabela 4. Fermentações em triplicatas.

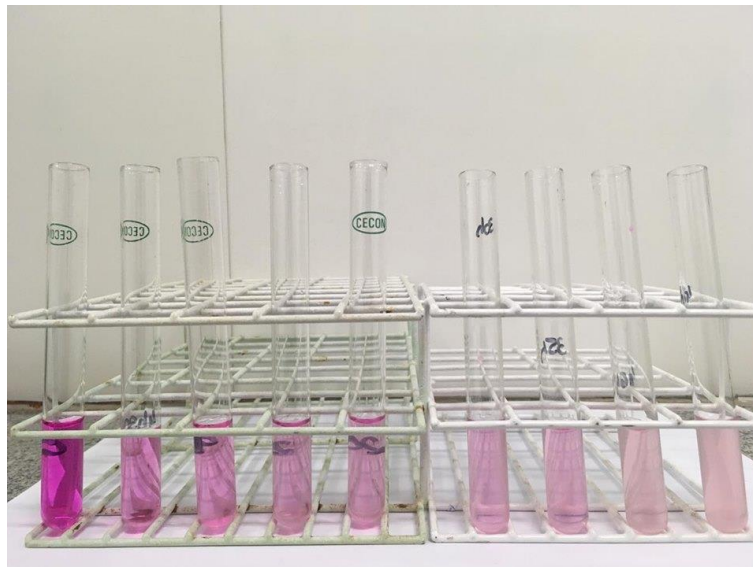
Tempo (horas)	Atividade enzimática (U/ml)	Média das atividades enzimáticas
24	7,160	6,280
	6,180	
	5,502	
48	4,672	6,205
	12,059	
	1,884	
72	5,652	5,702
	6,029	
	5,426	

Fonte: Elaborado pela autora.

Após ser efetuado o método para atividade enzimática, o caldo bruto foi centrifugado, e dessa maneira, foi utilizado o sobrenadante livre para a produção da ciclodextrina. A partir da coloração em cada tempo que as amostras foram retiradas

foi possível visualizar que houve a incorporação da fenolftaleína com a ciclodextrina, demonstrando a produção de ciclodextrina. Na figura 3, observa-se da direita para a esquerda 0,5ml das amostras retiradas nos tempos de 0,4,9,22,24,30,35,46 e 48 horas e adicionadas a 2,5ml de solução de trabalho, evidenciando a mudança de cor e por consequente a produção de ciclodextrina.

Figura 3. Formação da ciclodextrina a partir da visualização do complexo fenolftaleína-ciclodextrina.



Fonte: Dados da pesquisa.

3.3 Formação do Complexo de inclusão

Através do método em solução aquosa foram formados os complexos de inclusão que são diretamente proporcionais à concentração de β -ciclodextrina, à medida que aumenta a concentração da β -ciclodextrina diminui tanto o mono quanto o diramnofípídeo no meio aquoso. A figura foi confeccionada a partir de resultados quantificados por HPLC (Gráfico 5).

tempo pré-determinado observa-se a coloração rosa forte, evidenciando somente a presença da fenolftaleína. Já a β -ciclodextrina forma um complexo incolor estável com a fenolftaleína e assim ocorreu uma menor absorbância e diminuição na coloração rosa.

Para a verificação da propriedade complexante das ciclodextrinas, esse método baseia-se na formação do complexo da β -ciclodextrina com a fenolftaleína (BLANCO, 2009). A partir desse complexo formado, foi possível produzir uma variação na densidade ótica, sendo medida pelo espectrofotômetro, e também a observação acompanhando a intensidade da cor da solução. Segundo Makela et al (1988), essa mudança na cor ocorreu devido ao corante da solução que é desproporcional a concentração de β -CD.

A curva padrão da β -CD também segue esse parâmetro do método colorimétrico e forma-se uma reta decrescente, demonstrando que a partir da complexação da ciclodextrina com a fenolftaleína ocorreu o decaimento da absorbância.

A partir da formação dos complexos de inclusão que foi realizado pelo método de complexo em solução aquosa (RAJEWSKI; STELLA, 1996), foi possível constatar que essa formação realmente ocorreu, pois foi demonstrado através do encapsulamento do ramnolípido com a β -ciclodextrina a evidencia dessa propriedade da ciclodextrina que é a formação dos complexos de inclusão.

Por causa da propriedade de formar os complexos de inclusão, a ciclodextrina produzida em laboratório pode ser utilizada como uma metodologia para separação dos homólogos. O complexo da β -ciclodextrina com o ramnolípido mostrou-se viável uma vez que os dados do HPLC (gráfico 5) e da TLC (figura 4) sugerem que pode ocorrer a separação de homólogos através dessa metodologia. Observou-se que o monoramnolípido é o primeiro a complexar com a ciclodextrina, o que pode ser comprovado pela TLC. Além disso, também foi possível observar que não temos a presença de monoramnolípido na corrida a partir da amostra 8, mas quando há um aumento na concentração de β -ciclodextrina, observa-se que somente existe a presença de diramnolípido.

4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitem sugerir:

- A formação de halos, confirmou que o microrganismo *Bacillus lehensis* pode ser utilizado para a produção da enzima ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase).
- É possível inferir que a partir da concentração 8mM de β -CD (0,0908g de ciclodextrina) ocorreu o encapsulamento do monoramnolípídeo – confirmado na TLC da figura 4.
- A partir dessa metodologia de separação dos homólogos alguns parâmetros podem ser modificados para melhoramentos, como a mudança na quantidade de β -ciclodextrina ou de ramnolípídeo, além da realização em volumes maiores e em tempo mais curto para ocorrer uma otimização no processo para que seja viável e efetiva a utilização dos homólogos separados em diversos setores industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. and Biotechnol.** Oxford, v. 53, p. 495-508, 2000.

BLANCO, K.C. **Produção de ciclodextrina glicosiltransferase por *Bacillus* sp subgrupo alcalophilus: Otimização por planejamento experimental.** 95 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

BLANCO, K.C.; BERNARDI, N.S.; CONTIERO, J. Reutilization of Microbial Cells for Production of Cyclodextrin Glycosyltransferase Enzyme. **Journal of microbiology**, V.12(4), p. 229-235, 2017.

BLANCO, K.C.; BERNARDI, N.S.; LIMA, C.J.B.; MONTI, R.; MARTINS, J.R.; CONTIERO, J. *Bacillus lehensis*—an alkali-tolerant bacterium isolated from cassava starch wastewater: optimization of parameters for cyclodextrin glycosyltransferase production. **Ann Microbiol.**, v.62, p. 329–337, 2012.

BLANCO, K.C.; MORAES, F.F.; BERNARDI, N.S.; VETTORI, M.H.P.B.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Cyclodextrin production by *Bacillus lehensis* isolated from cassava starch: Characterisation of a novel enzyme. **Czech journal of food sciences**. V.32(1), p.48-53, 2014.

BLANCO, K.C.; SANTOS, F.J.; JANFELICCI, M.; FRANCHETTI, S.M.M.; CONTIERO, J. Submicrometric and nanometric solid phases obtained through reductive decomposition reaction of β cyclodextrin. **Turkish Journal of Biochemistry**. 40(5), p. 348-355, 2015.

CENTINI, M.; MAGGIORE, M.; CASOLARO, M.; ANDREASSI, M. FACINO, R. M.; ANSELM, C. Cyclodextrins as cosmetic delivery systems. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v. 57, p. 109-112, 2007.

CUCOLO, G. R.; ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; SILVA, R. Otimização da produção de CGTase de *Bacillus* sp subgrupo alcalophilus E16 em polvilho doce em fermentação submersa. **Braz. J. Food Technol.**, v.9, p. 201-208, 2006.

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

HEDGES, R.A. Industrial applications of cyclodextrins. **Chem Rev.** p. 2035–44, 1998.

INFORS MT. Cell Growth Quantifier – CGQ, c2019. Acessórios para agitadores. Disponível em:
<file:///C:/Users/carrefior/Downloads/INFORSHT_Flyer_CGQ_pt_web.pdf> Acesso em: 20 de jun. de 2019.

MAKELA, M.; KORPELA, T.K. Determination of the catalytic activity of cyclomaltodextrin glucanotransferase by maltotriose-methylorange assay. **J. Biochem Biophys.** v.15, p. 307-318, 1988.

MATIOLI, M.; ZANIN, G.; MORAES, F. F. Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. 5 ed. New York. 124 p, 2000.

MULLER, M.M, KUGLER, J.H., HENKEL,M.,GERLITZKI,M., HORMANN,B., POHNLEIN,M.,SYLDALK,C., HAUSMANN,R. Rhamnolipids- Next generatin surfactants?. **Journal of Biotechnology.** p. 366-380, 2012.

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

RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. **J Pharm Sci**; 85(11):1142-69, 1996.

SALIPIRA, K. L.; MAMBA, B. B. KRAUSE, R. W.; MALEFETSE, T. J.; DURBACH, S. H. Carbon nanotubes and cyclodextrin polymers for removing organic pollutants from water. **Earth Envir. Sci.**, v. 5, p.13-17, 2006.

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

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. In: **Chem. Rev**, p.1743-1753, 1998.

SZENTE, L. Preparation of Cyclodextrin Complexes. In: Comprehensive Supramolecular **Chemistry (Part II)**, v.3, p.243-252, 1996.

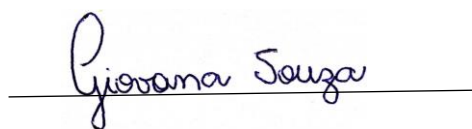
SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients, **Trends Food Sci Technol.** v.15, p.137-142, 2004.

WENZ, G. Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Structures and Functional Units. **Angew. Chem.** Int. Ed. Engl., v.33, p.803, 1994.

Assinaturas

A stylized, abstract handwritten signature in black ink, consisting of several vertical and horizontal strokes.

Prof. Dr. Jonas Contiero
Orientador

A handwritten signature in blue ink that reads "Giovana Souza" in a cursive script, positioned above a horizontal line.

Autora