



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

PAULA PATRÍCIA BORBA

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por amostras de *Bacillus* utilizando meios alternativos contendo substratos agroindustriais

Fevereiro de 2012

PAULA PATRÍCIA BORBA

**Produção de ciclodextrina glicosiltransferase
(CGTase) por amostras de *Bacillus* utilizando meios
alternativos contendo substratos agroindustriais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Fevereiro de 2012

B726p

Borba, Paula Patrícia

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por amostras de *Bacillus* utilizando meios alternativos contendo substratos agroindustriais / Paula Patrícia Borba ; orientador Carlos Alberto Alves da Silva ; co-orientador Galba Maria de Campos Takaki, 2012.

xii, 86 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2012.

1. Ciclodextrina Glucosiltransferase. 2. *Bacillus* sp. 3. Substratos alternativos agroindustriais. I. Título.

CDU 574.6

BORBA, P.P.

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por espécies de *Bacillus* utilizando substratos alternativos agroindustriais. Recife, 2012, 84p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2012.

1. Ciclodextrina Glicosiltransferase. 2. Ciclodextrinas. 3. *Bacillus* sp.
Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por amostras de *Bacillus* utilizando meios alternativos contendo substratos agroindustriais

PAULA PATRÍCIA BORBA

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva (Orientador)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP.

Prof.^a Dr.^a Hέλvia Waleska Casullo de Araújo
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Prof.^a Dr.^a Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Dedico

A minha mãe Sônia Maria Borba pela incessante dedicação e incentivo, sem ela eu não seria nada.

Ao meu pai Paulo Falcão Borba pelo suporte e apoio.

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.”

(Louis Pasteur)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meu Deus Excelso, único e absoluto que em sua magnífica bondade me concedeu saúde, força e perseverança. A Ele dedico toda honra e glória.

A meus pais por todo suporte em todos os momentos de minha vida. Meu pai, Paulo Falcão Borba, por que sempre me deu exemplo de humildade e simplicidade e à minha mãe, Sônia Maria Borba, por ter sido sempre um porto seguro.

Ao meu amor e amigo Antônio Rafael Barros Lins, pelo companheirismo, sincera amizade, paciência e apoio.

Aos orientadores Dr. Carlos Alberto Alves da Silva e Dra Galba Maria de Campos Takaki, pelo direcionamento e dedicação nos momentos decisivos.

Aos colegas de turma, em especial Rita de Cássia Freire Soares da Silva, pela amizade a mim dispensada desde a infância e pelo companheirismo durante o curso.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), pelos momentos de descontração e confraternização durante as pausas nos trabalhos, em especial Marta Cristina Freitas da Silva e Patrícia Mendes de Souza.

Aos alunos de Engenharia química e Bolsistas voluntários do NPCIAMB, Priscilla Ferreira Correa por sua dedicação ímpar nos trabalhos e seu colega Henrique Siqueira Amorim por seu coleguismo e contribuição nos trabalhos.

A Fundação de Amparo à ciência e tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

A Universidade Católica de Pernambuco e ao Núcleo de pesquisas de ciências Ambientais (NPCIAM – UNICAP) pela infraestrutura oferecida.

A todos que me dedicam sincera amizade e me ajudaram direta ou indiretamente, em todos os momentos de minha vida acadêmica.

Em fim, muito obrigada a todos por existirem em minha vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	
1.1 INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos	19
1.3 REVISÃO DA LITERATURA	20
1.3.1 Biotecnologia e os microorganismos	20
1.3.2 O gênero <i>Bacillus</i>	23
1.3.3 Enzimas microbianas	25
1.3.4 Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase)	27
1.3.4.1 Caracterização da CGTase: semelhanças e diferenças com outras enzimas degradadoras de amido	29
1.3.4.2 Produção por outros microorganismos	33
1.3.5 Ciclodextrinas (CDs)	33
1.3.5.1 Algumas áreas de aplicação das CDs	41
1.3.5.1.1 Aplicações das CDs na indústria alimentícia	41
1.3.5.1.2 Aplicações das CDs na indústria de fármacos	43
1.3.5.1.3 Aplicações das CDs na Indústria de cosméticos	44
1.3.5.1.4 Aplicações no meio ambiente	44
1.3.5.1.5 Aplicações das CDs na indústria têxtil	45
1.3.6 Rejeitos agroindustriais e o meio ambiente	45
1.3.6.1 Casca de batata inglesa	46
1.3.6.2 Soro de leite	49
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO II	
PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTase) POR AMOSTRAS DE <i>Bacillus</i> UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS	62
CAPÍTULO III	
CONCLUSÕES GERAIS	83
ANEXOS	84

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Estrutura de uma enzima	24
Figura 2 – Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase, sendo cada círculo representante de uma unidade de glicose	26
Figura 3 – Representação esquemática da organização dos resíduos de glicose nos polímeros amilose e amilopectina	28
Figura 4 – Representação esquemática de ação das enzimas degradadoras de amido. Esferas representam resíduos de glicose sendo que as verdes destacam extremidades redutoras	30
Figura 5 – Molécula de α -D-glucopiranos (na conformação cadeira), ou simplesmente monômero de glicose com as posições 1 e 4 indicadas pelas setas	33
Figura 6 – Representação da α -ciclodextrina em forma de cone oco, truncado, com os grupos hidroxilas localizados nas aberturas do cone	34
Figura 7 – CDs mais comuns	34
Figura 8 – Solubilidade em água (mg de CD/g) de α -CDs, β -CDs e γ -CDs em relação à temperatura (expressa em Kelvin)	36
Figura 9 – Representação esquemática do equilíbrio de formação do complexo de inclusão da CD-fenolftaleína. A molécula hóspede (em rosa) é a fenolftaleína e os círculos menores representam as moléculas de água.....	37

Capítulo II

Figura 1 – Fluxograma Básico da metodologia	66
Figura 2 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio tradicional	71

Figura 3 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo A1	72
Figura 4 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo A2	72
Figura 5 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo A3	73
Figura 6 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo B	73
Figura 7 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo C	74
Figura 8 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo D	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais aplicações das enzimas microbianas	26
Tabela 2 – Nomenclatura das enzimas com suas respectivas características.....	27
Tabela 3 – Fonte de amilose em amidos	30
Tabela 4 – Propriedades físico-químicas das Ciclodextrinas	36
Tabela 5 – Composição nutricional da Batata	48
Tabela 6 – Componentes da batata na matéria integral	49
Tabela 5 – Composição química do soro de leite	51

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Seleção de <i>Bacillus</i> produtores de CGTase em meio sólido em diferentes temperaturas (37°C e 45°C) e diferentes pHs (7,0 e 10)	70
Tabela 2 – Atividade específica de proteínas (CGTase) em meios alternativos	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Atividade enzimática
AEP	Atividade específica da proteína
CD	Ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
CGTase	Ciclodextrina glicosiltransferase
PT	Proteínas totais
UCP	Universidade Católica de Pernambuco
α -CD	Alfa ciclodextrina
β -CD	Beta ciclodextrina
γ -CD	Gama ciclodextrina

Resumo

As enzimas microbianas apresentam um elevado potencial biotecnológico e são utilizadas nas mais diversas áreas industrial e ambiental. A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é uma enzima com habilidade de converter amido em ciclodextrinas (CDs), sendo produzida por diversos microorganismos, principalmente por bactérias do gênero *Bacillus*, sendo principalmente aplicada nas indústrias de alimentos e farmacêutica. A utilização da formulação de meios alternativos considerados econômicos, tem gerado diversos estudos no sentido de substituir componentes dos meios tradicionais de produção, por substratos de resíduos industriais e agroindustriais de baixo custo e com elevado valor agregado. Neste sentido, foi realizada inicialmente, a seleção de amostras produtoras da enzima CGTase, tendo sido selecionado *Bacillus licheniformis* (UCP 1021), através da formação de halo característico em todas as condições testadas. Em seguida, estudos foram realizados para formulação de meios alternativos econômicos utilizando resíduos agroindustriais, casca da batata (*Solanum tuberosum* L) e soro de leite, na produção da CGTase. Na formulação dos meios em que a casca de batata substituiu o amido, foram utilizadas as concentrações de 2,5; 5 e 10 g/L, sendo denominados de A₁, A₂ e A₃. No meio denominado B, foi substituído a peptona por casca de batata (10 g/L), no meio C foi substituído extrato de levedura por soro de leite (5g/L), e no meio D foi substituído a peptona por soro de leite (5g/L). Todos os ensaios de produção da enzima, ocorreram a 37°C, 150 rpm, 84 horas. Os resultados obtidos evidenciaram que o meio padrão de produção obteve uma atividade específica de 0,120 µmol/mg em 24h, e verificou-se que todos os meios alternativos produziram a enzima, porém o meio denominado A₁ apresentou a maior atividade específica para β-CD (0,823 µmol/mg), em 12h, sugerindo assim que a utilização de meios econômicos contendo resíduos agroindustriais, é uma alternativa viável no processo de produção de diversos compostos bioativos utilizados na biotecnologia microbiana.

Palavras-Chave: Ciclodextrina Glucosiltransferase; *Bacillus* sp.; substratos alternativos agroindustriais.

ABSTRACT

The microbial enzymes have a high potential of biotechnology and are used in various industrial and environmental areas. The cyclodextrin-glycosyl transferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is an enzyme with the ability to convert starch into cyclodextrins, being produced by various microorganisms, mainly bacteria of the genus *Bacillus*, being mainly applied in the food and pharmaceutical industries. The use of the formulation of alternative considered economical, has generated several studies to replace components of traditional means of production by industrial waste substrates and agroindustrial low cost and high added value. Thus, it was initially performed, the selection of samples producing the CGTase enzyme and has been selected *Bacillus licheniformis* (UCP 1021), through the formation of larger halo on all conditions tested. Subsequent studies have been made to formulate alternative using cheap industrial residues, peel of potato (*Solanum tuberosum* L.) and milk serum, to produce the CGTase. In formulating the medium in which the peel of potato by starch, the concentrations used were 2.5, 5 and 10g/L, and are called A1, A2 and A3. In the medium called B was substituted peel of potato by peptone (10g/L), in medium C was substituted yeast extract by milk serum (5g/L), and medium D was substituted yeast extract peptone (5g/L). All the assays for enzyme production at 37°C, 150 rpm, 84 hours. The results showed that the standard means of production obtained an activity of 0.120 μ mol/mg in 24 hours, and found that all alternative produced the enzyme, but the middle called A₁ presented the highest specific activity for β -CD (0.823 μ mol/mg), in 12 hours, suggesting that the use of cheap media containing industrial residues, in an alternative process for the production of many bioactive compounds used in microbial biotechnology.

keywords: cyclodextrin glucosyltransferase; *Bacillus* sp.; alternative substrates agribusiness

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

As técnicas de biotecnologia já existiam desde o ano 1800 a.C, sendo o termo biotecnologia, utilizado somente no século XX (Brasil, 2008; DIAS, 2010). Essas técnicas acumularam-se ao longo dos anos com o propósito de satisfazer as necessidades sociais e ambientais, promovendo assim o avanço da ciência e transformando técnicas antigas em tecnologia (DIAS, 2010). Neste contexto entende-se que a biotecnologia é um ramo da tecnologia que se ocupa da aplicação de dados da engenharia e da biologia para sanar problemas decorrentes do relacionamento do homem com o ambiente que o cerca (PENNA e CANOLA, 2009). O meio ambiente foi durante muito tempo considerado como bens livres, para os quais não há necessidade de trabalho para sua obtenção, acarretando na apropriação indevida do ar, da água e do solo. Esse conceito dificultou a criação de critérios normativos para sua utilização, trazendo graves problemas ambientais que passaram a afetar a população (ROHLFES et al., 2011).

Os microorganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (FINLAY, MABERLY e COOPER, 1997; TORSVIK e ØVREÅS, 2002; NANNIPIERI et al., 2003). Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos microorganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (KENNEDY GEWIN, 1997; DAHLLÖF, 2002; MARON, MOUGEL, e RANJARD, 2011).

Os progressos científicos obtidos a partir de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana, têm sido considerados extensos e necessitam muitas vezes de pesquisas mais profundas nas funções exercidas pelas comunidades microbianas nos diversos ambientes e um conhecimento das suas interações com os outros componentes da biodiversidade microbiana existente. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados diretamente com a descoberta de microorganismos potencialmente exploráveis nos diversos processos biotecnológicos existentes para produção de novos antibióticos, agentes terapêuticos, probióticos, produtos químicos, enzimas, polímeros para aplicações industriais e tecnológicas, biorremediação de poluentes, biolixiviação e recuperação de minérios. Outros benefícios de estudos relacionados com as comunidades microbianas podem incluir o prognóstico e a prevenção de doenças emergentes em seres humanos, animais e plantas, e a otimização da capacidade microbiana para a fertilização dos solos e despoluição das águas (BÉRDY, 2005;

WETLER-TONINI, REZENDE, GRATIVOL, 2010; WACKETT, 2011; YRKM et al., 2011; KARIGAR RAO 2011; PETTIT, 2011; KUHAD, RISHI GUPTA, SINGH e 2011).

Diversas espécies de bactérias, como por exemplo, as do gênero *Bacillus*, composto por bactérias Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, esporuladas e amplamente distribuídas no ambiente, têm sido frequentemente aplicadas em biotecnologia, por serem relativamente fáceis de isolar e capazes de crescer em meios complexos sintéticos. Apresentam também capacidades fisiológicas de grande interesse da indústria biotecnológica, como por exemplo, gerar grande quantidade de metabólitos estáveis em diferentes temperaturas, além de terem efeito antagônico sobre outros microorganismos (DIAS et al., 2008; KUTA, NIMZING e ORKA'A, 2009).

Estes microorganismos possuem ainda uma alta capacidade em produzir e secretar uma grande quantidade de enzimas extracelulares (SCHALLMEY, SINGH, WARD, 2009; MANZANO et al., 2009), além de serem consideradas grandes produtoras de enzimas industriais (FENG et al., 2001; CHANTAWANNAKUL et al., 2002). Também são amplamente utilizadas na manufatura de enzimas comerciais, em bioinseticidas e no tratamento de água (PALLADINO, 2008).

Enzimas são macromoléculas de alta massa molecular constituídas de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (SALVADOR et al., 2009). Após os antibióticos, são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica por apresentarem diversas vantagens em relação a equivalentes de fontes animal e vegetal, além de representarem um recurso renovável (SANCHEZ e DEMAINE, 2002; DEMAINE e ADRIO, 2008) e apresentarem uma grande variedade de atividades catalíticas (REGINATO e TEIXEIRA, 2009). São amplamente utilizadas no processamento de alimentos, produção de detergentes (biológicos), indústrias têxtil e farmacêutica, na química orgânica, biologia molecular e aplicações médicas (DEMAINE, 2002; CHIRUMAMILLA et al., 2001; NAESSENS e VANDAMME, 2003).

Dentre as muitas enzimas já conhecidas, a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) tem despertado bastante interesse na indústria biotecnológica nos últimos anos. Esta enzima extracelular microbiana é capaz de converter amido em ciclodextrinas (CDs) que tem vasta aplicação principalmente nos setores industriais alimentícios, farmacêuticos e de produtos de limpeza. A CGTase de *Bacillus licheniformis* / *Bacillus subtilis* é uma enzima de caráter termofílico e alcalofílico que possibilita sua utilização sob altas temperaturas e pH alcalino. Desde sua descoberta vários microorganismos foram

descritos como produtores desta enzima, predominando o gênero *Bacillus* (KUO et al., 2009; MATTE, 2011).

As CDs, produto da ação catalítica da CGTase, são oligossacarídeos cíclicos formados por monômeros de glicose, unidos por ligações glicosídicas α -1,4. Esses monômeros estabelecem interações intermoleculares, formando um anel e conferindo rigidez à molécula de ciclodextrina (ABD-AZIZ, et al., 2007; LI, et al., 2007; MENOCCI et al., 2008; MORIWAKI et al., 2009; PAVLOV et al., 2010), essas moléculas apresentam um exterior hidrofílico, o que a torna solúvel em água, ao mesmo tempo possuem uma cavidade apolar (ASTRAY et al., 2009; HERMES, 2010; MATTE, 2011), isso confere uma capacidade de formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas hidrofóbicas (HERMES, 2010). A substância encapsulada sofre alterações em suas propriedades físico-químicas e em consequência disso ocorrem efeitos benéficos em diversos produtos, proporcionados pelo uso das CDs tornando-as muito atrativas para diversos setores industriais (ASTRAY et al., 2009; MATTE, 2011).

Dentre as limitações encontradas para a produção de enzimas, uma das principais são os custos altos referentes aos meios de produção. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo selecionar meios alternativos para a produção de CGTase por espécies de *Bacillus*, utilizando substratos alternativos agroindustriais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Selecionar espécies de *Bacillus* para produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) através da utilização de meios de cultura contendo substratos alternativos agroindustriais.

1.2.2 Objetivos específicos

- Selecionar amostras de bactérias do gênero *Bacillus* para produção da enzima CGTase no meio tradicional em diferentes condições de temperatura e pH;
- Produzir CGTase no meio tradicional (Nakamura e Horikoshi, 1976) a partir de condições e amostra de *Bacillus* selecionadas;
- Produzir CGTase em meios alternativos tendo como base o meio tradicional com substituição de substratos comerciais por agroindustriais, utilizando o microorganismo selecionado;
- Relacionar a produção da CGTase à cinética de crescimento do microorganismo selecionado e pH, observados em meios tradicional e alternativos;
- Comparar os resultados obtidos com o meio tradicional aos obtidos com os meios alternativos.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Biotecnologia e os microorganismos.

Segundo o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) a biotecnologia foi considerada uma das áreas mais promissoras entre os diversos desenvolvimentos tecnológicos emergentes, e por este motivo, o governo brasileiro elaborou o Decreto nº 6.041/2007 lançado em fevereiro de 2007 que regulamenta a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia (PDB), tendo sua implementação coordenada pelo Comitê Nacional de Biotecnologia (CNB) que foi instituído pelo mesmo decreto (BRASIL, 2008).

A biotecnologia pode ser compreendida como um ramo da tecnologia que se ocupa da aplicação de dados da engenharia e da biologia aos problemas decorrentes do relacionamento do homem com o ambiente que o cerca (PENNA e CANOLA, 2009). O termo foi conceituado pela Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) e estabelecido pelo decreto legislativo nº 2 de 1994 como “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica” (BRASIL, 2008; OLIVEIRA, 2009; DIAS, 2010).

Apesar de as técnicas da biotecnologia já existirem desde o ano 1800 a.C, o termo biotecnologia foi utilizado apenas no século XX. Antes o uso da fermentação limitava-se a produção de bebidas alcoólica a partir da uva, milho e mandioca e só mais tarde foi descoberto de forma natural que a partir da pele e sementes da uva que era possível obter o fermento responsável pela origem do pão, era a biotecnologia tradicional (BRASIL, 2008; DIAS, 2010). Ao longo dos anos acumularam-se, técnicas e instrumentos utilizados para satisfazer as necessidades sociais e ambientais que iam surgindo, e isto proporcionou o avanço da ciência que aprimorando técnicas antigas, às transformou em tecnologia (DIAS, 2010).

As inovações tecnológicas deram origem a biotecnologia moderna que teve início a partir dos anos 70, quando, em 1973 Herbert Boyer, na Califórnia, expressou o gene da insulina humana em uma bactéria do nosso intestino, a *Escherichia coli* (BRASIL, 2008). As novas atividades produtivas passaram a ser conhecidas como Biotecnologia Moderna, um termo utilizado para diferenciar esta nova área do uso clássico de seres vivos como uma ferramenta de produção, tanto em fermento industrial para alimentos, bebidas e muitas outras substâncias úteis; ou da genética clássica que

nos forneceu praticamente todos os cultivos atualmente utilizados na produção de alimentos ao redor de todo o mundo (OLIVEIRA, 2010). A aplicação da biotecnologia moderna é bastante ampla e se estende a setores industriais como na produção agrícola, química, farmacêutica, prospecção mineral, informática entre outros. (DIAS, 2010).

Há outros conceitos a cerca da Biotecnologia que têm definido e delimitado o que se denomina biotecnologia moderna, diferenciando-a da biotecnologia antiga, como por exemplo, o conceito trazido pelo Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança que se refere à Biotecnologia Moderna como “aplicação de técnicas de ácido nucléico *in vitro*, incluindo DNA e injeção direta de ácidos nucléicos em células ou organelas. Também integra um conjunto de tecnologias habilitadoras que possibilitam utilizar, alterar e aperfeiçoar organismos vivos ou suas partes funcionantes, células, organelas e moléculas para gerar produtos e processos e serviços especializados com aplicações diversas nas áreas de saúde, agropecuária e meio ambiente” (OLIVEIRA, 2010).

Segundo o anexo único do Decreto de Lei 6.041/2007, a biotecnologia é uma das ferramentas tecnológicas mais importantes da atualidade. Suas aplicações têm contribuído para a estruturação de novos sistemas econômicos e sociais, especialmente a partir da manipulação das menores estruturas que compõem os seres vivos (BRASIL, 2007). Tecnicamente, o termo biotecnologia representa um conjunto de tecnologias que utilizam sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para a produção ou modificação de produtos e processos para uso específico, bem como para gerar novos serviços de alto impacto em diversos segmentos industriais. (BRASIL, 2007; OLIVEIRA, 2010).

O Brasil, devido a sua imensa área voltada para a agricultura e seu clima favorável, tornou-se um gigante da Biotecnologia clássica. Além disso, dispõe de cerca de 70% de todos os animais, plantas e microorganismos registrados, cerca de 200 mil espécies e estima-se que este número possa chegar a um milhão e oitocentas mil espécies com imensos nichos geográficos ainda intocáveis pela ciência e ainda a ser explorado de forma moderna, sustentável e lucrativa. É praticamente um quinto de toda a biodiversidade mundial distribuída em seis biomas (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa), além da Zona Costeira e Marinha. Este é um grande diferencial competitivo do Brasil para o desenvolvimento da biotecnologia. (BRASIL, 2007; OLIVEIRA, 2010).

Atualmente empresas que utilizam a biotecnologia para o desenvolvimento da cadeia tecnológica de geração de seus produtos, processos e serviços contam com suporte técnico-científico oferecido pelas diversas instituições de ensino superior, por instituições estatais e por institutos de pesquisa, atuantes na geração de tecnologias, bens e serviços biotecnológicos, com aplicações, notadamente nas áreas de saúde, agropecuária, industrial e meio ambiente (BRASIL, 2007; OLIVEIRA, 2010).

A percepção da vantagem competitiva da Biotecnologia do Brasil surgiu no início da década de 80 (BRASIL, 2008; OLIVEIRA, 2010) e suas aplicações têm contribuído para a estruturação de novos sistemas econômicos e sociais, especialmente a partir da manipulação das menores estruturas que compõem os seres vivos. em um ciclo de cientistas pioneiros, empresários e pessoas políticas. Um forte apoio governamental tornou-se disponível para voltar às atenções de uma fração dos 20.000 bio-cientistas e engenheiros de laboratórios públicos e da indústria para a Biotecnologia (OLIVEIRA, 2010).

Em qualquer processo industrial de biotecnologia, atingindo alta produtividade, torna-se um fator essencial para o sucesso comercial. As produtividades máxima específica de uma estirpe de produção são geralmente independentes dos parâmetros de processo e determinado pelas propriedades genéticas e fisiológicas do organismo. Enzimas bacteriana extracelulares são uma importante classe de enzimas industriais que constituem aproximadamente 20% do mercado de enzimas (NIU, et al. 2009). A fermentação natural e espontânea é uma rica fonte para novos microorganismos com potencial industrial. O gênero *Bacillus* apresenta ampla distribuição em diversos ambientes e tem sido objeto de atenção para aplicação de seus membros em biotecnologia. Estas bactérias são relativamente fáceis de isolar e também capazes de crescer em meios complexos e sintéticos (DIAS et. al., 2008).

Os microorganismos são considerados essenciais para o meio ambiente, pois contribuem para a estabilidade dos diversos ecossistemas existentes, atuando como pontes biológicas entre os níveis tróficos, os fatores bióticos e abióticos, e também entre a biogeosfera e os diversos constituintes atmosféricos gasosos. São largamente distribuídos em nosso planeta, em inúmeras condições adversas, pois existem espécies que habitam locais considerados extremos, com temperaturas bastante elevadas ou extremamente baixas, em altas concentrações de salinidade, submetidas a pressões elevadas, em valores extremos de pH (SORIANO et al., 2000).

Esses organismos são também chamados coletivamente de microbiota, são representados por quatro grandes grupos: bactérias, fungos, algas e protozoários. Apesar de constituírem somente 1 a 4 % do carbono total e ocuparem menos de 5 % do espaço poroso do solo, a diversidade e a quantidade de microorganismos é bastante elevada. Entretanto, como o solo é normalmente um ambiente estressante, limitado por nutrientes, somente 15 % a 30 % das bactérias e 10 % dos fungos encontram-se degradando a matéria orgânica do solo (LYNCH, 1986; ARAÚJO e MONTEIRO, 2007).

Diversas espécies de microorganismos contribuem diretamente na reciclagem de vários compostos químicos existentes, inclusive muitos poluentes industriais (ZHANG e BENNETT, 2005; DEMAÏN e ADRIANO, 2008). As bactérias, por exemplo, apresentam características muito variadas, sendo encontradas diversas espécies produtoras de metabólitos biologicamente ativos, dentre eles muitos são de importância industrial e agrícola. As espécies de importância industrial apresentam um histórico principalmente nas indústrias de alimentos e antibióticos (SCHALLMEYER, SINGH e WARD, 2004; SIRTORI, 2006).

1.3.2 O Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, esporuladas, sendo amplamente distribuídas na natureza (solo, água e ar). Essas bactérias apresentam capacidades fisiológicas que permitem seu crescimento e competição favorável com outros organismos em diversos ambientes, devido à sua elevada capacidade em formar esporos e produzir uma grande quantidade de metabólitos estáveis em diferentes temperaturas e têm efeito antagônico sobre outros microorganismos (GOMES, 2008; KUTA, NIMZING e ORKA'A, 2009).

Este gênero é considerado como um dos maiores produtores de enzimas industriais, incluindo espécies encontradas na natureza (solo, água e ar), e algumas como participantes da biota intestinal (JAEGER et al., 1994; LOGAN e DE VOUS, 1998; JORGENSEN et al., 2000; FENG et al., 2001; CHANTAWANNAKUL et al., 2002).

O gênero *Bacillus*, tem atraído interesse desde 1872, pela extraordinária resistência de seus endósporos à agentes químicos e físicos, pelo ciclo de crescimento para formar esses endósporos e pela produção de antibióticos (PALLADINO, 2008). Também diversas espécies deste gênero possuem uma alta capacidade em produzir e secretar uma grande quantidade de enzimas extracelulares. A maioria são mesófilos com

temperaturas ótimas de crescimento entre 30 e 45 °C, porém o gênero contém um número de termofílicos representativos que crescem à temperatura de 65°C ou mais altas (STAINER et al., 1986). O gênero *Bacillus* é amplamente utilizado na indústria, na manufatura de enzimas comerciais, principalmente amilases e proteases e também em bioinseticidas e no tratamento de água (PALLADINO, 2008).

As espécies termofílicas, particularmente, têm contribuído para o desenvolvimento de uma grande variedade de novos produtos lançados recentemente no mercado. Esses novos produtos são caracterizados por possuírem uma temperatura adequada e elevadas propriedades de estabilidade após a produção enzimática (THANGAM e RAJKUMAR, 2002; SCHALLMEY, SINGH e WARD et al., 2004; MANZANO et al., 2009).

A fisiologia deste gênero é amplamente diversificada, suas características incluem a degradação de muitos substratos derivados de plantas e animais como fontes de carbono, incluindo celulose, amido, pectina, proteínas, hidrocarbonetos e outros. Muitas espécies de *Bacillus* são versáteis, capazes de utilizar uma variedade de substratos de baixo custo e de fácil disponibilidade, tais como os subprodutos da agroindústria (PALLADINO, 2008).

Quanto aos parâmetros que interferem na produção microbiana de enzimas, devem ser destacados os fermentativos, como: natureza e concentração dos substratos (inclusive estudos de repressão e indução na produção de enzimas), pH ótimo para o crescimento microbiano, produção e atividade enzimática, temperatura e tempo de incubação. Espécies do gênero *Bacillus* geralmente crescem bem em meios definidos contendo várias fontes de carbono. Muitos *Bacillus* produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam polímeros complexos, como polissacarídeos, ácidos nucléicos e lipídeos, permitindo aos organismos utilizarem esses produtos como fontes de carbono e doadores de elétrons (PALLADINO, 2008).

Com relação a classificação taxonômica, os estudos evoluíram bastante nos últimos anos com o avanço das técnicas moleculares existentes (RNA 16S), mas sua identificação e classificação ainda encontram algumas dificuldades, pois consomem muito tempo e são consideradas muito trabalhosas (DICKINSON et al., 2004), o que se faz necessário o emprego de métodos de combinações tradicionais, quimiotaxonômicas, moleculares e genéticas para se obter um completo perfil da família *Bacillaceae* (OGAWA et al., 2006).

1.3.3 Enzimas Microbianas

Após os antibióticos, as enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica, pois apresentam uma série de vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, tais como custos de produção relativamente baixos, susceptibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, espectro amplo de características físico-químicas de diferentes enzimas, geralmente relacionadas ao habitat e fisiologia do microorganismo produtor (organismos termofílicos produtores de enzimas termorresistentes), susceptibilidade de manipulação genética e representarem um recurso renovável (SANCHEZ e DEMAINE, 2002; DEMAINE e ADRIANO, 2008). Além disso, apresentam uma grande variedade de atividades catalíticas (REGINATO e TEIXEIRA, 2009).

Enzimas microbianas são amplamente utilizadas no processamento de alimentos, produção de detergentes (biológicos), indústrias têxtil e farmacêutica, na química orgânica, biologia molecular e aplicações médicas. A utilização ampla de enzimas é reflexo da elevada especificidade de sua ação como biocatalistas, porém enzimas com o mesmo perfil de atuação sob o substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer o screening de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas (CHIRUMAMILLA et al., 2001; DEMAINE, 2002; NAESSENS e VANDAMME, 2003).

Quimicamente, as enzimas são macromoléculas de alta massa molecular formadas por subunidades conhecidas por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. Os aminoácidos formam ligações covalentes entre si, pelo grupo amino de um aminoácido com o grupamento carboxílico de outro (figura 1), constituindo cadeias polipeptídicas extensas, que assumem um arranjo espacial complexo, cuja forma estrutural é difícil de ser determinada (SALVADOR et al., 2009).

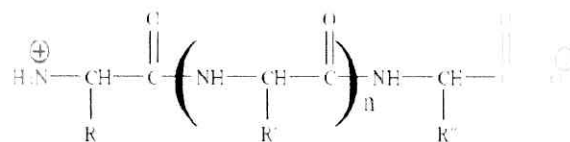


Figura 1 – Estrutura de uma enzima. Fonte: adaptada de Salvador, et al., 2009.

Os actinomicetos são importantes produtores de enzimas de aplicação industrial seguidos de espécies bacterianas de *Bacillus* e *Clostridium* (NAESSENS e VANDAMME, 2003). A biotecnologia atual tem possibilitado a produção industrial de enzimas específicas para diversas áreas de aplicação. Diversas espécies de fungos, bactérias e

leveduras podem produzir enzimas, por meio de técnicas de recombinação de DNA e mutações (CAMPESTRINI et al., 2005). As principais enzimas de aplicação industrial produzidas por microorganismos encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais aplicações das enzimas microbianas

Aplicação Industrial	Enzimas	Microorganismos
Detergentes	protease, amilase, lipase e celulase	<i>Bacillus</i> , <i>Humicola</i> , <i>Pseudomonas</i>
Produção de Amido	amilase, glucoamilase e glicose isomerase	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Clostridium</i>
Bebidas Destiladas	amilase, glucoamilase	<i>Aspergillus</i>
Indústria Têxtil	amilase, celulase, catalase	<i>Bacillus</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Humicola</i> , <i>Aspergillus</i>
Polpa e papel	Xilanase	<i>Trichoderma</i> , <i>Bacillus</i>
Chás	Tanase	<i>Aspergillus</i>
Vinhos e sucos	pectinase, celulase, celobiose, glicose oxidase, polifenol oxidase	<i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i>
Laticíneos	protease, lipase, lactase, sulfohidrogenase	<i>Rhizomucor</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Kluyveromyces</i>
Panificação	amilase, protease, glicose oxidase e xilanase	<i>Aspergillus</i> , <i>Bacillus</i>
Alimentação animal	fitase, celulase, xilanase	<i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Humicola</i>
Couros e derivados	Protease	<i>Aspergillus</i>
Alimentos, cosméticos, fármacos, produtos de limpeza, agrícolas e outros	ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus CGII alcalofílico</i> , <i>B.</i> <i>macerans</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B.</i> <i>subtillis</i> .

Fonte: adaptada de NAESENS e VANDAMME, 2003.

A utilização de enzimas em processos industriais tem sido amplamente discutido e cerca de 2500 reações diferentes, catalisadas por enzimas estão descritas no International Union Handbook of Enzyme Nomenclature. Estima-se que 80% das enzimas sejam produzidas por fermentação e muitas destas adicionadas em detergentes ou utilizadas no processamento de amido e de produtos lácteos (SONDEGAARD, GRUNERT e SCHOLDERER, 2005; TYO, KOCHARIN e NIELSEN, 2010). A ação catalítica das enzimas se faz através da redução de energia de ativação da reação, sem alteração do seu equilíbrio termodinâmico. Além disso, melhoram a velocidade de reação

e apresentam elevada especificidade que pode se expressar quanto ao tipo de reação ou de substrato (REGINATO e TEIXEIRA, 2009).

A International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) classificou as enzimas em seis grandes grupos (tabela 2), de acordo com o tipo de reação que catalisam.

Tabela 2 – Nomenclatura das enzimas com suas respectivas características

ENZIMA	CARACTERÍSTICAS
Oxido-redutases	Catalisam reações de oxidação-redução. O substrato oxidado é um hidrogênio ou doador de elétrons.
Transferases	Catalisam a transferência de grupos entre duas moléculas. O doador pode ser um cofator (coenzima) que carrega o grupo a ser transferido.
Hidrolases	Catalisam a reação de hidrólise de várias ligações covalentes.
Liases	Catalisam a clivagem de ligações C-C, C-O, C-N através de hidrólise ou oxidação. Há dois substratos envolvidos numa direção e só um na direção contrária da reação.
Isomerases	Catalisam a modificação de uma única molécula sem participação de outra.
Ligases	Catalisam reações de síntese de uma nova molécula a partir da ligação entre duas moléculas com a hidrólise de ATP ou outro composto trifosfatado.

Fonte: adaptada de SACKHEIM e LEHMAN, 2001.

1.3.4 Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase)

A ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase; EC 2.4.1.19, 1,4- α -D-glicana, 1,4- α -D-Glicopiranosil transferase) é uma enzima microbiana que catalisa a conversão do amido em ciclodextrina (CD) (MATIOLI et al., 2000; CUCOLO, 2009; MATTE, 2011). A CGTase é composta por uma cadeia única de polipeptídeos com aproximadamente 650 aminoácidos, possui uma ou nenhuma ligação intramolecular por pontes de dissulfeto e são dependentes de íons metálicos, principalmente o cálcio, para manter a sua atividade catalítica (MATIOLI et al., 2000; MATTE, 2011).

A conversão de amido em CD por esta enzima é realizada por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização). Além disso, há também atividade em reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento) e pode realizar reações de hidrólise de amido, conforme pode ser

visto na figura 2 (BENDER, 1985; TONKOVA, 1998; HIGUTI et al., 2004; CUCOLO et al., 2006; COSTA 2007; Matte 2011).

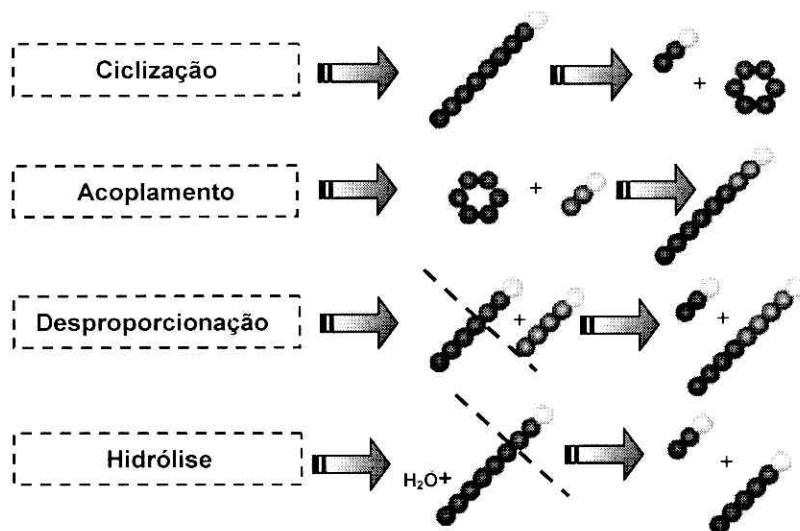


Figura 2 – Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase, sendo cada círculo representante de uma unidade de glicose. Fonte: adaptado de CUCOLO, 2009; MATTE, 2011.

O que ocorre na reação de transglicosilação, ou simplesmente ciclização, é que o amido (uma cadeia de oligossacarídeo linear) é clivado, então um novo açúcar com final redutor é transferido para o açúcar não redutor da mesma cadeia, o resultado é a formação de oligossacarídeos cíclicos não redutores denominados ciclodextrinas. Na reação de acoplamento acontece o inverso ocorrendo quando o anel de ciclodextrina é clivado e transferido para um substrato, o maltooligossacarídeo acceptor. Já na desproporcionação o maltooligossacarídeo linear é clivado e um novo açúcar com final redutor é transferido para um substrato de maltooligossacarídeo acceptor (CUCOLO, 2009; MATTE, 2011). A CGTase possui também uma atividade hidrolítica fraca, onde o amido é reduzido a dextrinas lineares e a água é o acceptor glicosil (JEMLI et al., 2007; OLIVEIRA, 2010).

Uma mistura de CDs (geralmente α -, β - e γ -CD) é produzida pela grande maioria das CGTases, as variações ocorrem dependendo das condições como a composição do tampão, pH, temperatura, e tempo de reação. Recentemente, pesquisas tem sido realizadas para aumentar o rendimento das CDs, bem como para melhorar as condições de reação enzimática das CGTases com o objetivo de produzir uma CD específica. Muitas dessas pesquisas demonstram que diferentes substratos podem determinar o tipo de CDs formadas a partir da reação enzimática (ALVES-PRADO, 2008; LEEMHUIS, KELLY, DIJKHUIZEN, 2010; MATTE, 2011).

Este bioproduto vem despertando grande interesse, devido ao aumento do uso das CDs principalmente nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (BINER, ANTRANIKAM e HEINZLE NINER, 2002; CARNEIRO et al., 2006; GUEDES et al., 2008; MATTE, 2011).

1.3.4.1 Caracterização da CGTase: semelhanças e diferenças com outras enzimas degradadoras de amido.

A CGTase apresenta uma seqüência de aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com a enzima α -amilase, por este motivo pode ser considerada da família das amilases (MATTE, 2011), no entanto ela é uma transferase. Para compreender a ação degradadora do amido dessas enzimas, é necessário primeiramente compreender a caracterização do amido.

O amido é o principal polissacarídeo de reserva energética do reino *plantae*, é considerado o biopolímero mais abundante depois da celulose, apresenta massa molecular elevada sendo formado de unidades de D-glucopiranoose (resíduos de glicose) unidas por ligações glicosídicas que são estáveis em pH alcalino, mas é hidrolisada em pH ácido. Há um aldeído latente no final da cadeia polimérica, este define a extremidade redutora do polímero que pode ser extraído de várias fontes, como por exemplo, cereais (milho, cevada, trigo, aveia, sorgo e arroz), tubérculos (batata) e raízes (mandioca e inhame) (CUCOLO, 2009; PY-DANIEL, 2010; ALMEIDA, 2010).

A amilose e a amilopectina, que são dois tipos de polímeros de glicose, formam o amido (figura 3). Insolúvel em água fria, a amilose é um polímero linear não-ramificada, formada por unidades de D-glicose unidas por ligações α -1,4. Cerca de 25% das fontes de amido encontradas na natureza é de amilose, mas dependendo da fonte botânica, maturidade fisiológica, condições de solo e clima, pode representar de 15 a 30%. Sendo a percentagem restante constituída pela amilopectina que é solúvel em água e é composta de pequenas cadeias lineares de resíduos de glicose unidos por ligações α -1,4 com ramificações de resíduos de glicose interligados por ligações glicosídicas do tipo α -1,6 (CUCOLO, 2009; FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009; BAUERMEISTER, A. et al, 2010; PY-DANIEL, 2010; ALMEIDA, 2010).

Dependendo da fonte botânica, a percentagem de amilose e amilopectina no amido é variável, conferindo a esse polímero características específicas (tabela 3), essas proporções influenciam na viscosidade e no poder de gelificação (CUCOLO, 2009).

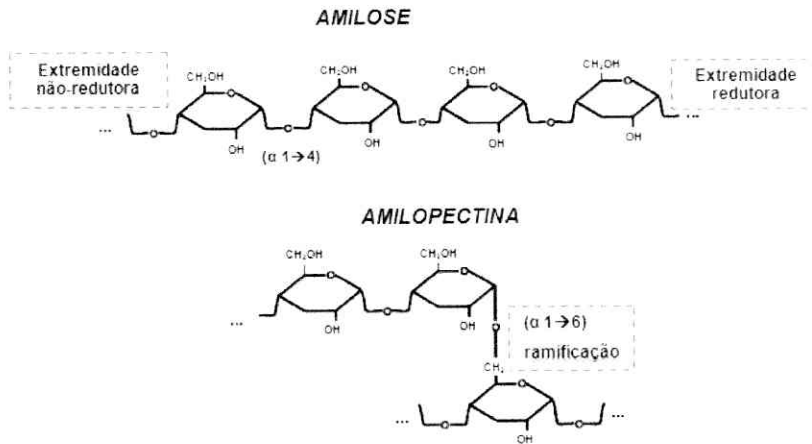


Figura 3 – Representação esquemática da organização dos resíduos de glicose nos polímeros amilose e amilopectina. Fonte: adaptada de PY-DANIEL, 2010.

Tabela 3 – Fonte de amilose em amidos

Fonte botânica	Teor de amilose (%)
Milho	21 a 25
Arroz	15-16-25
Batata doce	18
Mandioca	16-18-20
Batata	21 a 23
Banana	21 a 40
Trigo	20 a 24
Inhame	30
Aveia	16-33
Ervilha	30

Fonte: adaptada de ALMEIDA, 2010

Muitas enzimas denominadas amilases processam o amido, o resultado disso são diferentes produtos como oligossacarídeos e açúcares livres. O termo amilase é considerado genérico e existem ainda outras frações como a α -amilase (amilase dextrinogênica) e a β -amilase (amilase sacarogênica), entre outras como a CGTase (AGUIAR, 2001).

A utilização de enzimas amilolíticas tem aumentado abundantemente, e dentre essas enzimas, a CGTase vem ganhando grande importância industrial (CUCOLO, 2009). Várias fontes de amido podem ser utilizadas como substratos para produção de CGTase, incluindo amido de milho, batata, mandioca (MORIWAKI et al, 2009). Cucolo et al. (2006), obtiveram significativa produção da enzima CGTase utilizando também outras

fontes como batata-doce, fubá (que demonstrou melhor resultado), farinha de soja, farelo de trigo, polvilho-doce, soja, extrato de soja e farelo de soja.

Processos como a hidrólise ácida, ácida-enzimática ou só enzimática, são utilizados na produção de derivados do amido, sendo que a substituição de substâncias químicas por enzimas amilolíticas (endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases) tem sido vantajosa, tanto pela especificidade das enzimas, quanto pela hidrólise enzimática resultar em poucas reações intermediárias e menor escurecimento. Conforme mostra a figura 4, basicamente há quatro grupamentos de enzimas que degradam o amido (CUCOLO, 2009; Py-DANIEL, 2010):

- ✓ **Endoamilases** – essas enzimas tem ação endo, sendo um bom exemplo a α -amilase (EC 3.2.1.1) que quebram as ligações glicosídicas α -1,4 da parte interna das cadeias de amilose e amilopectina de forma aleatória, isso leva à formação de oligossacarídeos caracterizando α e α -dextrinas limite que são carboidratos ramificados de baixo peso molecular. Esta enzima é muito conhecida, podendo ser encontrada em uma ampla variedade de organismos de todos os domínios. (VANDER VEEN, et al., 2000; CUCOLO, 2009; Py-DANIEL, 2010).
- ✓ **Exoamilases** – Neste caso a ação é exo como as β -amilases (EC 3.2.1.2) que quebram as ligações α -1,4 a partir da parte final não-redutora do amido (resíduos externos de glicose da amilose e amilopectina), sendo o resultado isso, oligossacarídeos de massa molecular (glicose ou maltose) e β -dextrinas limite. Podendo agir em ambas ligações α -1,4 e α -1,6 como as enzimas glicoamilases (EC 3.2.1.3) que possuem maior afinidade por polissacarídeos de cadeia longa, e α -glicosidase (EC 3.2.1.20) que têm afinidade por pequenos maltooligosacarídeos (VAN DER VEEN et al., 2000; CUCOLO, 2009; Py-DANIEL, 2010).
- ✓ **Enzimas desramificadoras** – Isoamilase (3.2.1.68) e pululanase tipo I (EC 3.2.1.41), são exemplos de enzimas desramificadoras, sendo que a principal diferença entre essas enzimas é que enquanto a isoamilase podem apenas hidrolisar as ligações α -1,6 na amilopectina, a pululanase hidrolisam ligações α -1,6 tanto em pululano quanto em amilopectina. Porém ambas as enzimas só catalisam a degradação de moléculas de amilopectina no amido, sendo que os produtos da degradação destas duas enzimas são os oligossacarídeos longos. Pululanases do grupo II, também chamadas de α -amilases-pululanases ou amilopululanases também podem hidrolisar ligações α -1,4 e α -1,6, sendo a

maltose e maltotriose os produtos resultantes da degradação (VAN DER MAAREL et al, 2002; CUCOLO, 2009; Py-DANIEL, 2010).

- ✓ **Transferases** – Também consideradas de ação exo, a característica das transferases é a quebra de ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora transferindo parte do doador para um aceptor glicosídico, formando assim uma nova ligação glicosídica. Ressaltando que as amilomaltases (EC 2.4.1.25) e ciclodextrina glicosiltransferases (EC 2.4.1.19), formam uma nova ligação α -1,4, em contrapartida, a enzima ramificadora forma uma nova ligação α -1,6. (MARTINS e HATTI-KAUL, 2003; CUCOLO, 2009; Py-DANIEL, 2010).

Todas essas enzimas supracitadas estão representadas na figura 4, também os seus respectivos produtos de suas reações com o amido.

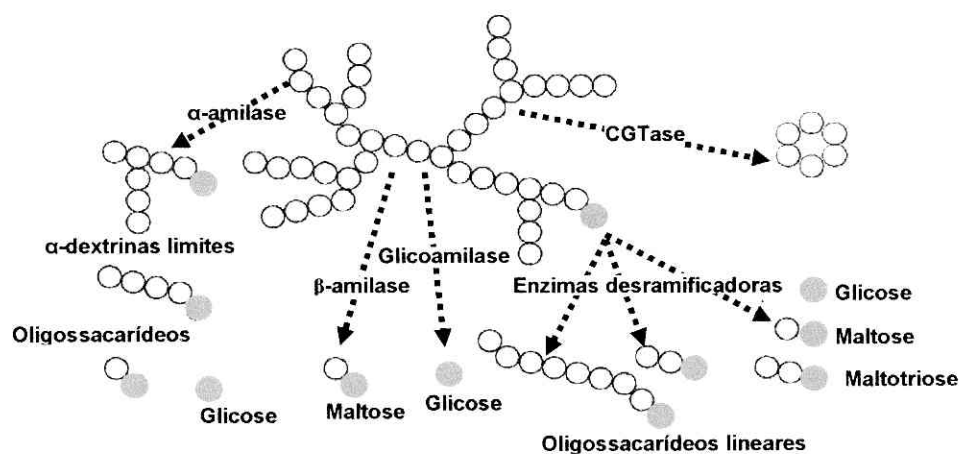


Figura 4 – Representação esquemática de ação das enzimas degradadoras de amido. Esferas representam resíduos de glicose sendo que as verdes destacam extremidades redutoras. Fonte: adaptada de PY-DANIEL, 2010.

A comissão de enzimas (do inglês Enzyme Commission – EC) obedecendo a recomendação da Internacional Union of biochemistry and molecular biology (IUBMB, 1992) atribui um número a todas as enzimas conhecidas. Sendo assim, glicosil hidrolases (endoamilases, exoamilases e enzimas desramificadoras) recebem o código EC 3.2.1.x e glicosiltransferases (transferases) recebem o código EC 2.4.1.x, onde x é o substrato específico e em determinados casos também representa o mecanismo molecular ou tipo de ligação. Esta classificação toma como base dois fatores: reação catalisada e especificidade do substrato, consistentes com o conceito de “chave-fechadura” proposto por Emil Fischer em 1894. Entretanto, o maior problema de uma classificação que toma como base a especificidade de substrato ou produto é o agrupamento indevido de

enzimas que atuam sobre substratos variados como uma determinada categoria (PY-DANIEL, 2010).

1.3.4.2 Produção por outros microorganismos

São relatados poucos estudos com a produção de CGTase em substrato sólido, provavelmente em virtude de os principais microorganismos produtores de CGTase pertencer ao gênero *Bacillus* e a fermentação em estado sólido ser mais favorável aos fungos filamentosos, muito embora, Ramakrishna et al (1994) e Cocolo et al. (2003) tenham obtido atividades da CGTase na fermentação em estado sólido semelhantes às obtidas em fermentação submersa utilizando *Bacillus cereus* e *Bacillus* sp subgrupo *alkalophilus* mesofílicos, respectivamente.

Desde a descoberta da CGTase vários microorganismos foram descritos como produtores desta enzima. Dentre as bactérias já identificadas como produtoras de CGTase inclui-se aeróbias mesofílicas, havendo predomínio do gênero *Bacillus* (*Bacillus macerans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus obhensis*, *Bacillus agaradhaerens* LS-3C, *Bacillus firmus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paenibacillus pabuli*), aeróbia termofílica (*Bacillus stearothermophilus*), algumas anaeróbias termofílicas (*Anaerobanca gottschalkii*) (AVCI e DONMEZ, 2009; KUO et al., 2009; MATTE, 2011).

Outros gêneros já foram caracterizados como produtores de CGTase, no entanto ainda não há nenhum relato a partir de leveduras e fungos. No Brasil, foram relatados *B. lentus*, *B. circulans* n°76, *B. firmus* n°37 e linhagem n°41, *Bacillus* sp subgrupo *alkalophilus* (ALVES-PRADO et al., 2002)

1.3.5 Ciclodextrinas (CDs)

O primeiro pesquisador que reportou a existência das ciclodextrinas (CDs) foi Villiers 1891, ele utilizou batatas para hidrolisar o amido com a bactérias *Bacillus amylobacter*, sendo denominado na época de celulosina (DEL VALLE, 2004; MENOCCI et al., 2008; FERREIRA, ROCHA, e SILVA et al., 2009; MATTE, 2011).

Em 1903, Franz Schardinger constatou que as CDs são o resultado da ação catalisadora da enzima CGTase sobre o amido, produzida na época pelo microorganismo *Bacillus macerans*. O pesquisador identificou que esta enzima é capaz de romper um segmento da hélice do amido e unir as duas porções terminais deste fragmento numa

única molécula cíclica (FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009). Todo o preparo, o isolamento, a caracterização e a determinação das estruturas dessas substâncias foram realizadas por Schardinger (1903-1911), como oligossacarídeos cíclicos contendo unidades de glicose “em conformação de cadeira” (Figura 5), nessa época os compostos foram chamados de açúcares Schardinger (MACEDO, 2010).

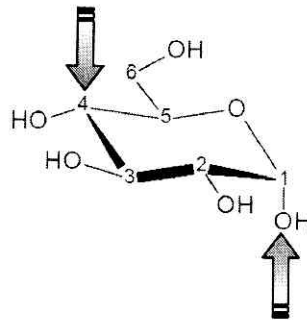


Figura 5 – Molécula de α -D-glicopiranos (na conformação cadeira), ou simplesmente monômeros de glicose com as posições 1 e 4 indicadas pelas setas. Fonte: adaptada de MACEDO, 2010.

Em 1938, Tilden e Hudson descobriram que as CDs não eram produtos sintetizados durante o metabolismo microbiano, sendo compostos de ação extracelular de uma enzima microbiana. Somente na década de 50 é que as pesquisas sobre CDs começaram a se intensificar (MATTE, 2011).

No início da década de 40 sem avanços significativos, Freudenberg e colaboradores descreveram as CDs como são conhecidas atualmente (compostos macrocíclicos constituídos de unidades glicopiranosídeas conectadas através de ligação glicosídica α -1,4) (MACEDO, 2010).

Em meados dos anos 50, French e Freudenberg ampliaram os conhecimentos sobre as CDs no que se refere a produção enzimática, fracionamento e a caracterização de suas propriedades. Cramer, Saenger e outros enfatizaram os estudos na formação de complexos de incluso entre as CDs e moléculas hospedes (MACEDO, 2010).

Na metade da década de 70, as CDs naturais já tinham sido caracterizadas estrutural e quimicamente e muitos complexos tinham sido estudados. Devido a capacidade de complexação, ao baixo custo e as inúmeras vantagens que elas apresentam, houve um grande progresso no desenvolvimento de novas tecnologias para sua produção e aplicação (MACEDO, 2010).

Em estado natural, as CDs (também conhecidas como cicloamiloses ou cicloglucanos) são moléculas rígidas, cristalinas, homogêneas, não higroscópicas (FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009; MACEDO 2010), relativamente estáveis e resistentes à ação da maioria das exoamilases (HERMES, 2010). Quimicamente, CDs são oligossacarídeos cíclicos formados por monômeros de glicose, unidos por ligações glicosídicas α -1,4 (Figura 5). Estes monômeros estabelecem interações intermoleculares, formando um anel e conferindo rigidez à molécula de ciclodextrina (ABD-AZIZ, LI et al., 2007; MENOCCI et al., 2008; MORIWAKI et al., 2009; PAVLOV et al., 2010).

Os monômeros do anel de CD são dispostos de forma que o segundo grupamento hidroxila (C2-C3) é localizado na extremidade maior do anel, e o primeiro grupamento hidroxila (C6) na extremidade menor, resultando numa molécula de forma cilíndrica (HERMES, 2010). Para melhor visualização, pode-se comparar sua estrutura a forma de uma rolha oca (MACEDO, 2010). Os hidrogênios apolares C3 e C5, bem como seus oxigênios estão na parte interna e os grupamentos hidroxila na parte externa da molécula de ciclodextrina (HERMES, 2010), resultando assim em uma molécula com exterior hidrofílico, o que a torna solúvel em água, ao mesmo tempo possui uma cavidade apolar, conforme se observa na figura 6 (ASTRAY et al., 2009; HERMES, 2010; MATTE, 2011), conferindo a capacidade de formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas hidrofóbicas (HERMES, 2010).

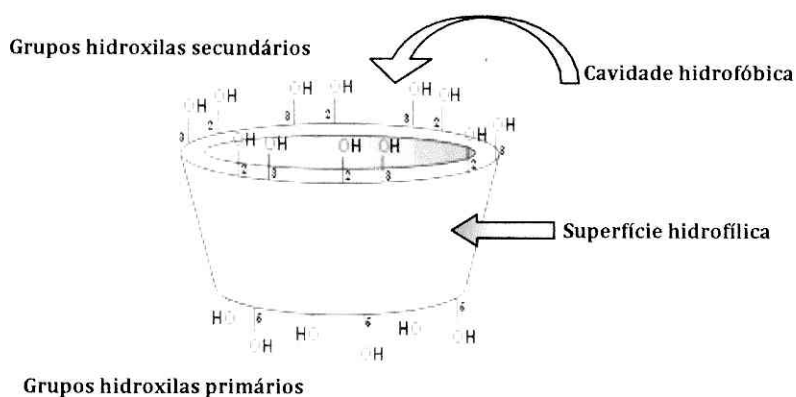


Figura 6 – Representação da α -ciclodextrina em forma de cone oco, truncado, com os grupos hidroxilas localizados nas aberturas do cone. Fonte: adaptada de MACEDO, 2010.

Em biotecnologia e bioengenharia, a complexação molecular é muito usada para realização de seleção, separação e solubilização de diversificadas biomoléculas, por isso, o uso das CDs revela-se vantajoso devido a especificidade de formação de complexos (HERMES, 2010).

A enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) catalisa as reações que normalmente produzem uma mistura de CDs com números diferentes de monômeros de glicose. As CDs mais empregadas para fins comerciais e científicos são do tipo α -, β - e γ -CDs, consistindo de seis, sete e oito monômeros de glicose, respectivamente (Figura 7) (FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009; MACEDO, 2010; MATE, 2011). Outras CDs maiores podem ser formadas, algumas CDs chegam a ter mais de 100 unidades de glicose (LI et al., 2007; MATTE, 2011), outras com 9 a 13 unidades, estas são macrociclos elípticos com estrutura cíclica distorcida, embora não existam atualmente tecnologias eficientes para produzir CDs com mais de 8 unidades de glicose em nível industrial e em quantidades maiores (ANDREAUS et al., 2010).

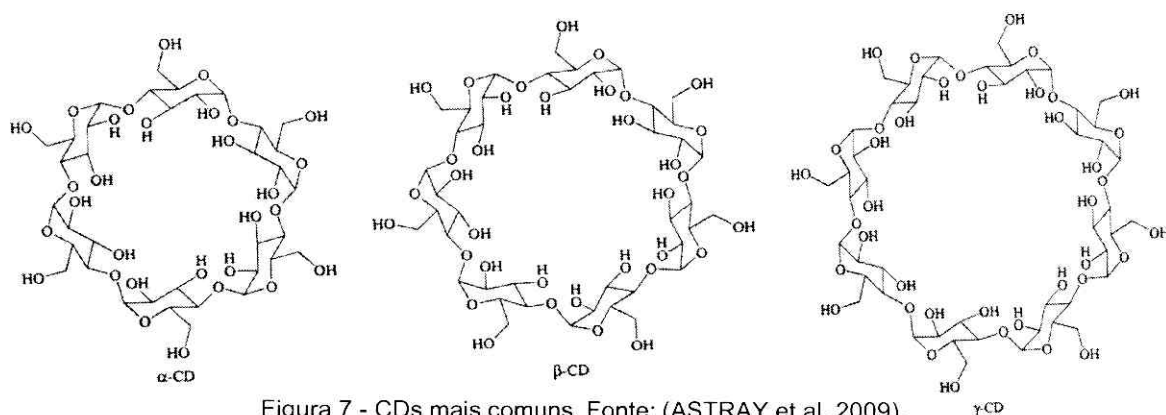


Figura 7 - CDs mais comuns. Fonte: (ASTRAY et al, 2009).

A forma tridimensional e o tamanho das moléculas de ciclodextrinas colocadas na tabela 4 exibe informações importantes a respeito da formação de complexos com moléculas hidrofóbicas.

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas

Características	α -ciclodextrina	β -ciclodextrina	γ -ciclodextrina
Número de monômeros de glicose	6	7	8
Massa Molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água (g/L – 25°C)	145	18,5	232
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro interno (Å)	4, 7-5,3	6, 0-6, 5	7, 5-8, 3
Volume da cavidade interna (Å ³)	147	262	427

Fonte: Adaptada de MATTE, 2011.

Apesar de o tamanho da cavidade aumentar com o número de unidades de glicose, a altura permanece constante em 6,7-7,0 Å (MACEDO, 2010). A β -CD apresenta

a menor solubilidade e tamanho intermediário (MACEDO, 2010; MATTE, 2011), como pode-se observar na figura 8 e na Tabela 4. Essa baixa solubilidade provavelmente é causada pela formação de ligações de hidrogênio entre os grupos OH ligados aos átomos de carbono C2 e C3 levando a rigidez da estrutura. Na molécula de α -CD, como uma unidade glicose está numa posição distorcida, somente 4 das 6 possíveis ligações de hidrogênio são estabelecidas. Por outro lado, as unidades de glicose na molécula de γ -CD não são coplanares, a estrutura da γ -CD é mais flexível e, portanto, esta é a mais solúvel das três (MACEDO, 2010).

A solubilidade de CDs depende da temperatura como mostra a figura 8. Segundo Astray et al. (2009) e Matte (2011), com a elevação da temperatura a solubilidade das CDs aumenta rapidamente, isso permite uma recristalização fácil quando ocorre o resfriamento. A hidrossolubilidade das CDs é incomum, pois a β -CD é pelo menos nove vezes menos solúvel (1,85 g/100 mL, à 25°C) do que as outras CDs (14,5 g/100 mL e 23,2 g/100 mL para a α -CD e γ -CD, respectivamente), conforme tabela 4.

A característica mais marcante das ciclodextrinas é a sua capacidade em formar complexos de inclusão com uma grande variedade de substâncias em virtude da sua estrutura geométrica com a cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica. Esse fenômeno, denominado como “encapsulação molecular” pode melhorar as propriedades químicas e físicas da molécula encapsulada (LI et al., 2007; GUEDES et al., 2008; MENOCCI et al., 2008; FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009; MATTE, 2011).

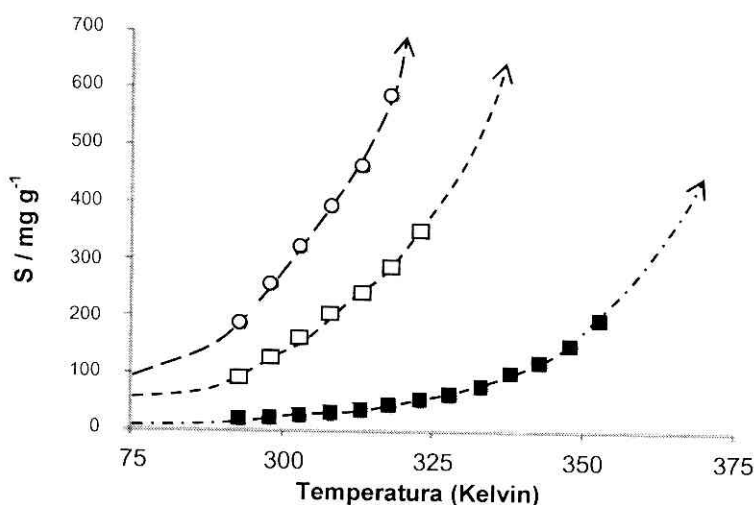


Figura 8 – Solubilidade em água (MG de CD/g) de (□) α -CDs, (■) β -CDs e (o) γ -CDs em relação à temperatura (expressa em Kelvin). Fonte: adaptada de Astray et al., 2009; Matte, 2011.

Quando a molécula é encapsulada pela CD não ocorre absorção de energia, no entanto, observa-se um aumento na temperatura de fusão, de aproximadamente 10°C.

As CDs não têm ponto de fusão definido, mas começam a se decompor a partir de 200°C, sendo suas propriedades térmicas exatas dependentes do teor de água, da estrutura cristalina, do grau de aquecimento e também da composição da atmosfera (MATTE, 2011).

Segundo os seus respectivos tamanhos, as moléculas complexadas são encapsuladas de maneira total ou parcial, cabendo a ciclodextrina o papel de molécula “hospedeira” ou receptora. Em muitos casos, as adições são formadas mesmo quando o tamanho molecular do componente a incluir não permite a completa inserção dentro da cavidade central (MATE, 2011). Se a molécula a ser complexada com a CD tiver dimensões maiores que as da cavidade, ela não consegue entrar completamente na mesma e, se tiver dimensão muito pequena, ela acaba por passar pela cavidade sem ser complexada (MACEDO, 2010; MATTE, 2011).

O fenômeno de encapsulação é explicado pela formação de “tampa” para a cavidade da ciclodextrina ou a inserção de alguns grupos funcionais no interior da cavidade. Em solução aquosa, a cavidade fracamente apolar da ciclodextrina é ocupada por moléculas de água que podem ser facilmente substituídas por moléculas “hóspedes”, menos polares que a água. Um bom exemplo desse fenômeno é a encapsulação de moléculas de fenolftaleína que são menos polares que a água (MATTE, 2011).

Esse fenômeno pode ser usado para a determinação das CDs produzidas na reação através de métodos colorimétricos, pois a inclusão dessas moléculas pelas CDs altera a absorção espectrofotométrica (BLANCO, 2009; MATTE, 2011). A β -CD forma um complexo incolor estável com a fenolftaleína, e por isso ocorre extinção de absorbância da solução na qual a β -CD é sintetizada pela CGTase (Figura 9). A atividade enzimática é determinada acompanhando a intensidade da cor da solução contendo o corante que é inversamente proporcional a concentração de β -CD (MAKELA et al., 1988; BLANCO, 2009; MATE, 2011).

De acordo com o método colorimétrico de detecção da atividade enzimática descrita por MAKELA et al., 1988 a absorbância da solução final deve ser analisada por espectrofotometria a 550nm, pois neste comprimento de onda a coloração rosa da fenolftaleína em meio básico, possui uma maior absorbância (BLANCO, 2009). Pinto, (2007), adaptou a seus experimentos um outro método colorimétrico descrito por Kaneco, et al. (1987), no qual relatam que a fenolftaleína, que é um indicador ácido-base, atinge sua máxima coloração rosa em pH 10,5, formando complexo de inclusão com as β -CDs em solução aquosa, na razão molar de 1:1 (MATTE, 2011).

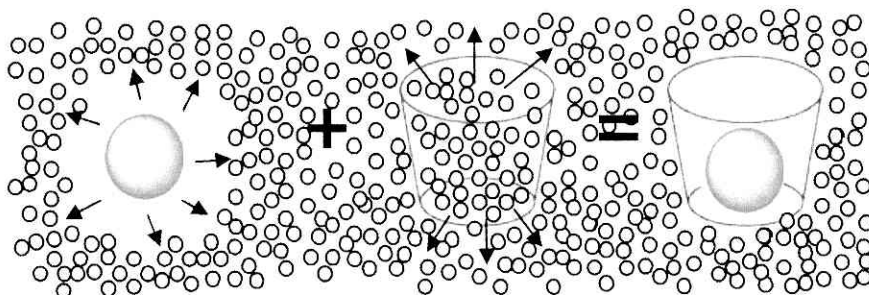


Figura 9 – Representação esquemática do equilíbrio de formação do complexo de inclusão da CD-fenolftaleína. A molécula hóspede (em rosa) é a fenolftaleína e os círculos menores representam as moléculas de água. Fonte: adaptada de MATTE, 2011 e BLANCO, 2009.

As interações envolvidas na formação dos complexos são forças de van der Waals, interações dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio. Essas ligações são fortes o suficiente para impedir a separação do complexo, mesmo em estado sólido, mas fracas o bastante para permitir a liberação da molécula encapsulada, quando necessário (VENTURINI et al., 2008; MATTE, 2011). As ciclodextrinas α , β e γ podem ser facilmente separadas do conteúdo desta reação por precipitação seletiva, mediante adição de determinados solventes orgânicos. Com a encapsulação da molécula pode haver formação de compostos sólidos, líquidos ou gasosos. Os complexos de inclusão são relativamente estáveis e facilmente separados das soluções devido a sua cristalinidade (MATTE, 2011).

A substância encapsulada passa a apresentar alterações em suas propriedades físico-químicas, o resultado disso é uma melhor estabilidade, solubilidade ou cinética de dissolução, biodisponibilidade e menor volatilidade. Em consequência dessas alterações ocorrem alguns efeitos benéficos proporcionados pelo uso de CDs como: proteger princípios ativos contra a oxidação pela luz, calor e volatilidade; mascarar, reduzir ou eliminar odores e sabores indesejáveis; estabilizar cores, tintas, sabores, vitaminas, temperos ou emulsões e; aumentar a solubilidade de drogas e substâncias químicas. Estas propriedades tornam as CDs muito atrativas para diversos setores industriais (ASTRAY et al., 2009; MATTE, 2011).

Dentre as CDs conhecidas, as β -CDs são as mais utilizadas, pois sua produção é a mais economicamente viável e é de mais fácil recuperação industrial através do processo de cristalização, sendo seu custo industrial por quilograma, cerca de 20 vezes menor do que o praticado para a α -CD e γ -CD. As β -CDs são produzidas industrialmente por dois processos (MATTE, 2011):

- ✚ Conversão não controlada (sem agentes complexantes) com subsequente sacarificação das dextrinas lineares do amido não convertido pela enzima. Este método proporciona um rendimento de 18 a 24% e é muito utilizado no Japão;
- ✚ Conversão controlada empregando tolueno (5% v/v) como agente complexante, proporcionando um rendimento de 33%. Este processo é muito utilizado na Hungria.

Nos últimos anos, estudos envolvendo as CDs têm apresentado um crescimento grande, popularizando-se em diferentes campos, como na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, na área têxtil e em biotecnologia (MATTE, 2011).

Embora seja um derivado enzimático do amido, ainda existem controvérsias e diferenças na regulamentação do uso de CDs nos alimentos entre os países. Nos EUA as α -, β - e γ -CDs são reconhecidos como produtos naturais e sua comercialização no setor alimentar está restrito apenas por considerações de pureza. Já na Austrália e na Nova Zelândia α - e γ -CDs são classificadas como novos alimentos a partir de 2004 e 2003, respectivamente (ASTRAY et al., 2009; MATTE, 2011). Segundo Astray et al. (2009) a recomendação do Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), para um nível máximo de β -CDs nos alimentos é 5 mg/kg por dia. Para a α - e γ -CDs não há Dose Diária Aceitável (DDA) devido ao seu perfil toxicológico favorável.

Há outros aspectos não menos relevantes a respeito das CDs que devem ser considerados. Segundo Hermes (2010) e Matte (2011), essas moléculas apresentam sabor doce, portanto ao serem utilizadas no processamento de alimentos, o seu poder adoçante deve ser considerado, pois uma solução de 2,5% de β -CD é tão doce quanto uma solução de 1,7% de sacarose. Os autores afirmam que elas são consideradas um edulcorante novo e promissor (MATTE, 2011).

Também é importante que todos os componentes constituintes de substâncias responsáveis pelo sabor sejam encapsulados de forma que não seja alterada sua composição (ASTRAY, 2009; MATTE, 2011). O sabor amargo de fármacos, alimentos ou de qualquer outra substância dissolvida em solução aquosa ou na saliva, pode ser reduzido ou totalmente eliminado se o componente amargo formar um complexo de inclusão com uma CD apropriada (VENTURINI et al., 2008; MATTE, 2011).

Com a evolução de campos recentes do conhecimento, como a química supramolecular, a nanotecnologia e a química verde, as CDs podem, pelo seu baixo

custo, grande disponibilidade e baixa toxicidade, serem empregadas para atuar como encapsuladores eficientes, e assim, auxiliar na solução dos diferentes tipos de problemas que se descortinam. Assim, as CDs vêm apresentando um papel de destaque em inúmeras áreas, tais como na montagem de sistemas de liberação controlada de fármacos e em terapia imunomodulatória (MATTE, 2011).

Novas técnicas visando o aumento da produção de ciclodextrinas e o aperfeiçoamento das CDs já existentes vêm ganhando importância uma vez que há uma comercialização crescente de produtos empregando ciclodextrinas no mercado mundial. Com isso, a melhora na produção de CDs têm sido o objetivo de muitos pesquisadores em todo o mundo. Uma maior produção de CDs é observada nos estudos com microorganismos com boa atividade de CGTase, os quais visam a diminuição dos custos de produção e, portanto, o aumento da disponibilidade de CD para o setor industrial (CUCOLO et al., 2006).

A redução nos custos de produção de ciclodextrinas está relacionada diretamente ao tipo da fonte de carbono utilizada para a produção da enzima CGTase e das próprias CDs. A natureza e a concentração da fonte de carbono são fundamentais para a produção da enzima CGTase, especialmente quando a fonte de carbono atua como fator de indução da enzima. A expressão de algumas enzimas pode variar marcadamente em função da fonte de carbono e nitrogênio utilizados, ou dos parâmetros físico-químicos envolvidos na fermentação (CUCOLO et al., 2006).

Neste contexto, um dos objetivos do presente trabalho é a otimização da produção de CGTase, avaliando substratos agroindustriais (farinha de casca de batata e soro de leite) como fontes alternativas de Carbono e Nitrogênio.

1.3.5.1 Algumas áreas de aplicação das Ciclodextrinas

1.3.5.1.1 Aplicações das CDs na indústria alimentícia

As mudanças no estilo de vida das pessoas inclina-se cada vez mais a procura de alimentos naturais de confiança. Um grande número desses alimentos há adição de compostos químicos, daí o interesse por agentes naturais tem aumentado significativamente na indústria alimentícia. Neste sentido, as CDs, entre outras aplicações, podem ser utilizadas para:

- ✚ **Inibição do escurecimento enzimático** – Segundo Matte (2011), as CDs formam complexos de inclusão com os precursores do escurecimento, uma vez encapsulados, estes compostos se tornam indisponíveis havendo assim a inibição da reação de escurecimento enzimático em sucos de vegetais e frutas. Isso ocorre por que o efeito da polifenol-oxidase é evitado pela remoção dos compostos fenólicos por complexação com CDs, assim os compostos fenólicos são protegidos da oxidação enzimática.
- ✚ **Desodorização de alimentos** – Alguns alimentos têm um odor peculiar, todavia, quando as CDs são adicionadas na produção, estes componentes formam complexos de inclusão com CDs, resultando na desodorização do produto final. É o que acontece, por exemplo, com o leite e a proteína de soja (ASTRAY et al., 2009; MATTE, 2011).
- ✚ **Extração de compostos oleosos de aroma** – As β -CDs podem ser utilizadas para a extração desses compostos diretamente de fontes naturais como o alho e a cebola, por exemplo, sem a necessidade de utilização de solventes ou destilação, apenas utilizando a centrifugação. Podendo-se após o processo utilizar o complexo insolúvel ou ainda descomplexação e a separação em uma fase aquosa, que contém as CDs, e uma fase oleosa imiscível (CEREDA, 2003; MATTE, 2011).
- ✚ **Remoção de colesterol da gordura** – Pode ser aplicada no leite ou na gema de ovos pela precipitação de complexos de inclusão cristalinos e complexação com β -CDs (CEDERA, 2003; MATTE, 2011; ANDREAUS et al., 2010).
- ✚ **Remoção de ácidos graxos livres** – É realizada para melhorar as propriedades de frituras (CEDERA, 2003; MATTE, 2011)
- ✚ **Proteção de vitaminas e componentes lipofílicos** – A encapsulação desses componentes dos alimentos e vitaminas do complexo B para proteção contra a oxidação, degradação térmica e reações com outros componentes, como a encapsulação de óleo da casca de limão para utilização em tortas para realçar o sabor (CEREDA, 2003; ASTRAY 2009, MATTE, 2011).
- ✚ **Estabilização e melhoramento de sabores e aromas** – A encapsulação de agentes adoçantes como o aspartame estabiliza-os e melhora o gosto, eliminando o sabor amargo. Também a estabilização de aromas e a proteção contra

decomposição oxidativa, induzida por luz e por calor (SINGH, SHARMA, e BANERJEE, 2002; MATTE, 2011; ANDREAUS et al., 2010)

Outras aplicações ainda como, a extração da cafeína do café ou chá (CEREDA, 2003; MATTE, 2011); A estabilização de *Flavours* naturais ou sintéticos por complexação com β -CDs (MATTE, 2011; SZENTE e SZEJTLI, 2004; ANDREAUS et al., 2010); A estabilização de óleos essenciais voláteis de chás, permitindo menores taxas de deterioração e menores perdas de aroma quando armazenados por longo tempo e/ou quando submetidos a altas temperaturas, como no processo de pasteurização ou cozimento (CEREDA, 2003; ASTRAY et al., 2009; MATTE, 2011); além disso, evita contaminações microbianas e reações de Maillard (ANDREAUS et al., 2010).

1.3.5.1.2 Aplicações das CDs na indústria de fármacos

As CDs são muito utilizadas na química medicinal sendo aplicadas à tecnologia de liberação controlada de fármaco. Os sistemas de liberação são vantajosos se comparados a outros de dosagem convencional, pois alteram significativamente alguns parâmetros farmacocinéticos como a meia-vida do fármaco, sua depuração do organismo e seu volume de distribuição, além disso, a toxicidade de medicamentos é também drasticamente reduzida, desta forma diminui os efeitos colaterais e adversos. Outras vantagens na utilização das CDs em fármacos são o aumento da biodisponibilidade, solubilidade, estabilidade e índice terapêutico, além de melhorar as propriedades organolépticas como o sabor e o cheiro de substâncias ativas (FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009; MACEDO, 2010; ANDREAUS et al., 2010).

A β -CD, tem uma particularidade em relação às outras CDs por possuir uma cavidade com tamanho adequado para conter uma ou duas moléculas de um grande número de substâncias com atividades farmacológicas, por este motivo, ela é uma das CDs mais utilizadas no processo de encapsulação de fármacos (MACEDO, 2010).

Vários fatores determinam o tipo e a natureza da CD necessária para um tratamento terapêutico específico, ou seja, para cada fármaco é possível utilizar uma CD mais adequada. Os fatores que auxiliam nessa escolha são: Natureza química do fármaco, tamanho da cavidade, solubilidade, facilidade de preparação, possibilidade de co-encapsulação e eficiência de encapsulação (MACEDO, 2010).

1.3.5.1.3 Aplicações das CDs na indústria de cosméticos

A complexação de moléculas com CDs também é muito utilizada na preparação de cosméticos, como exemplos, pode-se citar a diminuição da volatilidade de perfumes e a complexação de triclosan que aumenta a disponibilidade de antimicrobiano na formulação de creme dental. A estabilização, o controle do odor e o aperfeiçoamento do processo envolvendo a conversão de um ingrediente líquido para a forma sólida são os principais benefícios dessas macromoléculas neste setor (FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009).

1.3.5.1.4 Aplicações das CDs no meio ambiente

A aplicação de CDs tem ganhado importante papel no desenvolvimento de metodologias para a destoxificação (remoção do caráter tóxico) de muitos compostos potencialmente agressivos aos sistemas vivos. Os hidrocarbonetos clorados, por exemplo, possuem alta toxicidade, sendo que os voláteis causam efeitos deletérios sobre a camada de ozônio, enquanto os compostos bifenílicos policlorados (PCBs) têm impacto sobre a saúde humana. Estudos têm sido feitos para a aplicação de CDs no desenvolvimento de metodologias que promovem a degradação destes compostos (SINGH, SHARMA e BANERJEE, 2002; FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009).

Além do baixo custo, da capacidade de aumentar a solubilidade dos hidrocarbonetos para a biodegradação e biorremediação, CDs também podem diminuir a toxicidade beneficiando o aumento da microbiota e crescimento das plantas. β -ciclodextrinas aceleram a degradação de todos os tipos de hidrocarbonetos que influenciam a cinética de crescimento, produzindo maior rendimento de biomassa e uma melhor utilização dos hidrocarbonetos como fonte de energia e de carbono. Compostos responsáveis pelo odor percebido nas proximidades de sistemas de processamento de água podem ser eliminados por meio de oxidação, filtração e processos de degradação biológica com resultados parcialmente eficazes, enquanto que a aplicação de CDs e seus derivados têm demonstrado ter um melhor papel como anfitriões para estes compostos altamente hidrofóbicos. Outro papel importante das CDs na proteção ambiental é o seu uso na formulação de inseticida e na fotodegradação de pesticidas organofosforados em água, catalisando as interações dos pesticidas com os radicais reativos gerados pelo fotossensibilizador húmicos (SINGH, SHARMA e BANERJEE, 2002)

β -CD apresentaram alta capacidade de sorção para descontaminar águas contendo corantes têxteis (ANDREAUS., et al., 2010).

Na área agrícola as CDs formam complexos com uma variedade de compostos como herbicidas, fungicidas, inseticidas, feromônios e reguladores de crescimento, As aplicações potenciais das CDs nesta área atendem ainda a outras questões importantes, tais como a liberação controlada dos substratos, biodegradabilidade da molécula receptora, possibilidade de efeitos catalíticos sobre a degradação de pesticidas e mesmo a solubilidade dos complexos formados em água, o que deve permitir a fácil remoção dos agroquímicos no solo (FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009).

1.3.5.1.5 Aplicações das CDs na indústria têxtil

Sendo a indústria têxtil representante de uma parte importante da economia brasileira e mundial, é comum a constante busca por processos mais eficientes, econômicos e ecologicamente mais corretos. Neste sentido as CDs têm despertado o interesse de vários grupos de pesquisa e fabricantes de auxiliares têxteis pela sua origem natural, tamanho nanométrico e propriedades formar complexo de inclusão com diversas moléculas químicas. Ainda há poucas aplicações práticas na indústria têxtil devido ao custo relativamente alto das CDs, muito embora os preços de produção tenham caído e novas aplicações se tornaram possíveis nos últimos anos (ANDREAUS et al., 2010).

No segmento industrial têxtil, as CDs podem ser utilizadas como auxiliares nos processos de lavagem, tingimento e acabamentos, podendo ser fixadas na superfície das fibras, modificando assim as suas propriedades, o que resulta no enobrecimento do material têxtil. Além de serem biodegradáveis, não ocasionando problemas nos efluentes têxteis, as CDs melhoram a biodegradabilidade de muitas substâncias orgânicas tóxicas, além de não serem tóxicas, pois não causam irritações na pele ao serem utilizadas em tecidos (ANDREAUS et al., 2010) A interação de aromas com CDs é ainda de especial interesse para o desenvolvimento de produtos têxteis aromaterápicos (FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009)

1.3.6 Rejeitos agroindustriais e o meio ambiente

Nos últimos anos a utilização de substratos agroindustriais regionais e de baixo custo tornou-se muito interessante, pois além da facilidade de aquisição, apresenta um custo relativamente baixo. Segundo Rohlfs et al., 2011, sempre foi difícil a relação entre desenvolvimento e conservação ambiental, apesar disso, a preocupação em relação aos impactos ambientais negativos tem crescido nos últimos anos. Barbosa et al., 2011,

afirmam que a minimização de resíduos pode ser uma alternativa bem sucedida para a indústria de alimentos e demais ramos industriais, já que são considerados potenciais poluidores.

Os subprodutos gerados no processamento dos vegetais constituíam problemas econômicos e ambientais, entretanto, atualmente são considerados fontes promissoras de compostos funcionais, desta forma, diversos resíduos oriundos do processamento de alimentos podem ser utilizados por outros segmentos da indústria (BARBOSA et al., 2011).

A constante e crescente necessidade de suprimento de matéria-prima para as indústrias e produtos de boa qualidade tem levado ao desenvolvimento de novos produtos obtidos a partir de resíduos que antes eram descartados mas que hoje são reaproveitados e inseridos em formulações onde substituem outros ingredientes, proporcionando produtos de alto valor nutricional, com características desejáveis, além de gerar valor agregado para as indústrias (BARBOSA et al., 2011).

O aproveitamento dos subprodutos da agroindústria de alimentos diminui os custos da produção, aumenta o aproveitamento total do alimento e reduz o impacto que esses subprodutos podem causar ao serem descartados no ambiente. Dessa forma, alguns subprodutos da batata são aproveitados e transformados em ingredientes alimentícios, como é o caso da sua casca (FERNANDES et al., 2008).

Uma forma de atuação, no que diz respeito ao aproveitamento de resíduos, é a de buscar utilizações viáveis e econômicas para os inevitáveis resíduos agroindustriais gerados. Sempre que possível, o resíduo final deverá se constituir em matéria-prima para um novo processo, constituindo uma segunda transformação (CEREDA, 2000; FERNANDES et al., 2008). Neste contexto o presente trabalho apresenta uma maneira de aproveitar a casca da batata (*Solanum tuberosum* L.) e o soro de leite, que são dois tipos diferentes de rejeitos agroindustriais. Neste contexto, no presente estudo foi utilizado a casca de batata para produção de um bioproduto que é muito utilizado em diversos segmentos industriais.

1.3.6.1 Casca de Batata inglesa

A batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) é considerada a principal hortaliça no Brasil, que além de ser rica em carboidratos, contém proteínas de alta qualidade, boa

quantidade de vitamina C e algumas do complexo B, contém niacina, tiamina e vitamina B6. É também fonte de sais minerais como ferro, fósforo, magnésio e potássio. Boa parte desses nutrientes concentra-se em sua casca, especialmente ferro, cálcio, potássio, fósforo, zinco, vitamina B e boa quantidade de fibra, além de conter uma concentração de 45% de amido (FERNANDES et al., 2008).

A cultura desse tubérculo tem grande importância agrícola, alimentar e econômica. Em 2007 foram cultivados aproximadamente 24 mil hectares com batata no Rio grande do Sul, sendo em todo Brasil cerca de 150 mil hectares, resultando numa produção nacional estimada em 3,38 milhões de toneladas (HELDWEIN, et al., 2012).

A batata inglesa é amplamente aproveitada na indústria alimentícia como na produção de amido (panificação) e álcool (vinho), na produção de “chips” e outros. Aproximadamente 35% da batata produzida é descartada, sendo no Brasil mais de 300 mil toneladas de cascas de batata desperdiçadas por ano (BALSALOBRE, 1995; FERNANDES et al., 2008). No processo de industrialização da batata há vários tipos de perdas (FERNANDES, 2006):

- Farelo da batata: resíduo do processamento da batata que é desidratado e moído;
- Batata úmida: resíduo da batata empregada na alimentação humana. No geral, a maior proporção é a casca da batata utilizada sem desidratação;
- Torta de filtração da batata: representa cerca de 20% do resíduo total da batata; oriunda do processo de extração do amido da batata através do desidratador (filtração a vácuo);
- Flakes de batata: resíduo do cozimento da batata, esmagado e desidratado;
- Polpa de batata: permanece depois da extração do amido com água quente;

Esses subprodutos não estão disponíveis no Brasil, já que as indústrias não chegam a processar o resíduo. A maior fonte de resíduos de batata no país está nos descartes do campo (processo de lavagem e seleção ou quando o preço inviabiliza a comercialização) também a produção de batata de boa aparência, destinada ao consumo humano, são usados na alimentação animal (FERNANDES, 2006).

Também certos resíduos provenientes do processamento industrial podem trazer sérios problemas ambientais, como a irrigação de solos com a água residual da batata

que contamina a superfície dos mesmos, trazendo odores desagradáveis e levando nitrogênio e fósforo para o subsolo. Além disso, a purificação destes resíduos aumenta os custos de produção de produtos de consumo, como o amido cru, e outros (FERNANDES et al., 2008).

A composição nutricional da batata está descrita na Tabela 5 onde há uma comparação entre os valores nutricionais da batata crua sem casca e com casca.

Tabela 5 – Composição nutricional da Batata

Constituintes (em 100g)	Batata crua sem casca	Batata crua com casca	Casca da batata*
Fibra (%)	0,4	3,3	2,9
Calorias	78,5	-	-
Água	83,29	-	-
Vit. A (retinol) (μ)	6	-	-
Vit. B1 (μ)	90	-	-
Vit. B2 (μ)	30	-	-
Niacina (mg)	1500	-	-
Vit. C (mg)	17,4	-	-
Cobre (mg)	-	-	-
Enxofre (mg)	43	-	-
Magnésio (mg)	-	30	16
Manganês (mg)	-	0,602	0,74
Zinco (mg)	0,200	0,440	0,24
Potássio (mg)	394,4	407,0	12,60
Sódio (mg)	47,40	-	-
Cálcio (mg)	9	-	-
Ferro	-	1,0	-
Fósforo (mg)	69	-	-

Adaptado de LUENGO, 2000; FERNANDES, 2006.

Nota: *somente a pele

Com relação à composição química, a batata é composta aproximadamente por 76% de água, 20% de carboidratos, 2% de proteínas e uma pequena quantidade de lipídeos. Estima-se que proximadamente 80% dos carboidratos desse tubérculo é de amido, com uma proporção de 75% – 79% de amilopectina e 21% – 25% de amilose. A batata é também uma razoável fonte de vitamina C (OLIVEIRA, REIS e PEREIRA 2004; FERNANDES, 2006), sua composição química está descrita na Tabela 6.

Tabela 6 – Componentes da batata na matéria integral

Componentes	Média (%)	Variação (%)
Umidade	77,5	63,2 – 86,9
Sólidos totais	22,5	13,1 – 36,8
Carboidratos totais	19,4	13,3 – 30,5
Proteínas	2,0	0,7 – 4,6
Cinzas	1,0	0,44 – 1,9
Fibras	0,6	0,17 – 3,48
Lipídeos	0,1	0,02 – 1,0

Adaptado de SMITH, 1997; FERNANDES, 2006.

A batata sem a casca perde boa parte de seu potencial nutritivo, passando a ser um alimento de alto índice glicêmico, devido à perda das fibras e ao desequilíbrio resultante entre o teor de carboidratos e de proteínas (FERNANDES, 2006).

1.3.6.2 Soro de leite

O soro de leite, tecnicamente chamado de “lactossoro” é um subproduto resultante da fabricação de queijo coalho. Sua composição contém em média, 6,9% de sólidos totais, 0,6% de sais minerais, 0,3% de gordura, 0,9% de proteínas, 5,0% de lactose e 0,1% de ácido láctico resultante da fermentação da lactose. Essas concentrações representam aproximadamente 24.300 toneladas de sais minerais, 36.450 toneladas de proteínas, 12.150 toneladas de gordura e 202.500 toneladas de lactose, evidenciando que o soro pode ser um poluidor potencial. O extrato seco do soro de leite é aproximadamente de 7%, onde 4,5% correspondem à lactose, 0,9% às proteínas solúveis e 0,6% a sais minerais. O volume de leite destinado a fabricação de queijos, em média de 75% a 85% resulta em soro (BARBOSA et al., 2010; MORRILL et al., 2012; ROHLFES et al., 2011).

No processo de fabricação do queijo, a caseína é insolubilizada no seu ponto isoelétrico pela ação da renina e o líquido restante é chamado de soro doce. Se o soro for obtido por precipitação ácida, é chamado então de soro ácido (PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008). Este subproduto tem sido estudado como alternativa na produção de diversos componentes da indústria de alimentos e derivados (CALDEIRA et al., 2010; FORNARI, 2006; NITSCHKE, RODRIGUES e SCHINATTO, 2001; OLIVEIRA et

al., 2008; PELEGRINE, CARRASQUEIRA, 2008; VALDUGA et al., 2006; ZAVAREZE MORAES e SALAS-MELLADO, 2010; SALES, TAKAKI e ALVES da SILVA, 2011).

Cada litro de soro lançado no ambiente sem o devido tratamento ocasiona uma Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de 30.000 a 60.000 mg/L, podendo ser considerado bem mais poluente que o esgoto doméstico. em que aproximadamente 30 g a 50 g de oxigênio dissolvido na água desaparecerão (BARBOSA et al., 2010; ROHLFES et al., 2011)

Nas décadas de 70 e 80 este rejeito foi classificado como resíduo de baixo ou nenhum valor comercial sendo usado apenas na alimentação de animais ou descartado em efluentes sem nenhum tratamento (WALZEN et al., 2002, BARBOSA et al, 2010; ROHLFES et al., 2011; MORRILL et al., 2012), mas atualmente, a legislação ambiental tem sido mais rígida e com isso a indústrias de laticínios têm procurado alternativas para aproveitamento do soro. Dentre as várias técnicas de aproveitamento do soro do queijo destaca-se como substrato para fermentação, também é muito utilizado no Brasil, na produção de bebidas lácteas, no entanto esse aproveitamento atinge apenas 15% do soro produzido (BARBOSA et al, 2010; ROHLFES et al., 2011; MORRILL et al., 2012).

Além da poluição ambiental, o descarte do soro é também um desperdício de material proteico e outros nutrientes (Tabela 7), uma vez que retém perto de 60% dos nutrientes do leite. O desperdício do soro aliado ao seu valor nutritivo desperta a atenção do meio científico para a criação de alternativas economicamente viáveis com o aproveitamento das proteínas (alto valor nutricional e comercial), gordura residual e, principalmente, a lactose, principal responsável pelo impacto causado nos mananciais (SISO, 1996; CHERYAN, 1998; ALMEIDA, BONASSI e ROÇA, 2001; ANDRADE, 2005; BIASUTTI et al., 2008; SALES, TAKAKI e ALVES da SILVA, 2011; ROHLFES et al., 2011).

A maior dificuldade para o aproveitamento do soro de leite é que ele é visto como resíduo e não como matéria-prima e por isso não há uma preocupação em buscar técnicas para conservação e estabilidade do mesmo, como a aplicação de baixas temperaturas ou concentração para garantir sua qualidade (ROHLFES et al., 2011).

MORRILL et al., 2012 através de análises laboratoriais constataram que o soro de leite tipo doce resultante da fabricação de queijo coalho, apresentam composição química descrita na tabela 7.

Tabela 7 – Composição química do soro de leite

Característica	Valores
Nitrogênio (mg L ⁻¹)	860
Fósforo (mg L ⁻¹)	300
Potássio (mg L ⁻¹)	1500
Sódio (mg L ⁻¹)	370
Cálcio (mg L ⁻¹)	220
Magnésio (mg L ⁻¹)	180
Condutividade elétrica (dS m ⁻¹)	5,5
pH	4,1

Fonte: adaptada de MORRIL et al., 2012

A produção de queijo de coalho no Brasil é restrito a região Nordeste, em destaque aos estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco e sua produção rural tem participação considerável na economia no setor produtor de leite (BARBOSA et al., 2010).

Existem carências na infra-estrutura ligada à industrialização de queijo como o alto consumo energético e de água para o tratamento e lançamento de efluentes que devido ao alto custo é frequentemente negligenciados nas médias e pequenas indústrias. Dentre os principais impactos ambientais gerados por estes produtores destaca-se a geração de quantidades significativas de efluentes líquidos com elevada carga orgânica gerando impactos ambientais negativos. No Brasil, cerca de 40% do soro de leite produzido é descartado sem tratamento adequado (ROHLFES et al., 2011).

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-AZIZ, S. et al.. A rapid screening method for CGTase-producing bacteria using different starches as carbon source. **Malays. Appl. Biol.** A 3P6I(D2)-S: C1R-5 2007.
- AGUIAR, C. L.. Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 119-138, jan./jun. 2001.
- ALVES PRADO, H. F., ET AL. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 5, p. 189-196, 2002.
- ALVES-PRADO H. F., et al. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* Using Different Starches as Substrates. **Appl Biotechnol.**, v. 146, p. 3-13, 2008.
- ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia Alimentícia**, v. 21, n. 2, p. 187-192, 2001.
- ALMEIDA, D. M.. Biofilme de blenda de fécula de batata e celulose bacteriana na conservação de fruta minimamente processada. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná. p 31-33 (283 f.). Curitiba 2010.
- ANDRADE, A, C. Efeito da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*, 2005. 97 p. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2005.
- ANDREAUS, J.; DALMOLIN, M. C.; OLIVEIRA-JUNIOR, I. B. de O.; BARCELLOS, I. O. *Revisão: APLICAÇÃO DE CICLODEXTRINAS EM PROCESSOS TÊXTEIS*. **Química Nova**, Vol. 33, No. 4, 929-937, p. 929-937, 2010.
- ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R. Indicadores biológicos de qualidade do solo, **Bioscience Journal**, v. 23, n.3,p.66-75, 2007.
- ASTRAY, G., GONZALEZ-BARREIRO, C., RIAL-OTERO, R. e SIMAL-GÂNDARA. A review on the use of cyclodextrins in food. **Food Hydrocolloids**, 23, 1631-1640, 2009.
- AVCI., DONMEZ S. A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase. **Process Biochem.**, v44., p. 36-42, 2009.
- BALSALOBRE, M.A.A. Batata, beterraba, cenoura e nabo. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 6., 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, 1995. p.99-121.
- BARBOSA, A. S., et al. Estudo cinético da fermentação do soro de queijo de coalho para produção de aguardente. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**. v. 5, n. 3, p. 237-254, 2010.
- BARBOSA, J. R.; BELTRAME, S. C.; BRAGATTO, M. M.; DÉBIA, P. J. G.; BOLANHO, B. C.; DANESI, E. D. G. **Revista Tecnológica**, Edição Especial V Simpósio de Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, pp. 21-28, 2011.

BAUERMEISTER, A., et al.. β -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 2, p. 75-86. Londrina, 2010.

BENDER, H. Studies on the inhibition by maltoligosaccharides of the glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al with glycogen. **Carbohydr. Research**, 153, 291-302, 1985.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v.58, n.1, p. 1-26, 2005.

BIASUTTI, E. A. R. et al. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 51-60, 2008.

BINER, A., ANTRANIKAM, G. HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 59, 609-617, 2002.

BLANCO, K. C. Produção de ciclodextrina glicosiltransferase por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*: Otimização por planejamento experimental. Dissertação de mestrado. 96 p., Rio claro, 2009.

BRASIL, Ministério da ciência e tecnologia. **Biotecnologia**. Última atualização em 2008. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/3546.html>>. Acesso em: 27 de julho de 2011.

BRASIL, **Decreto nº 6.041, de 8 de fevereiro de 2007**. Institui a Política de desenvolvimento da Biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências. Última atualização em 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato20072010/2007/Decreto/D6041.htm#_ftn3#_ftn3>. Acesso em: 27 de julho de 2011.

CALDEIRA, L. A. et al. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2193-2198, 2010.

CAMPESTRINI, E.; MOZER DA SILVA, V. T.; APPELT, M. D.. UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, nº6, Artigo Número 27, p.259-272, 2005.

CARNEIRO, A. J., et al. Escurecimento enzimático em alimentos: ciclodextrinas como agentes antiescurecimento, **Alim. Nutr.**, 17 (3), 345-352, 2006.

CEREDA, M. P. Manejo, uso e tratamento da industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, v. 4, 320 p. 2000.

CEREDA, M. P. (Coord.) Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill. (**Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**, v.3. , 711 p. 2003.

CHANTAWANNAKUL, P., ONCHAROEN, A., KLANBUT, K., CHUKEATIROTE, E. e LUMYONG, S. Characterization of Proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from Traditionally Fermented Soybean in Northern Thailand, **Science Asia**, v 28, p. 241-245, 2002.

CHERYAN, M. Ultrafiltration and microfiltration handbook. Lancaster: **Technomic Publishing Company**, 1998. 527 p.

CHIRUMAMILLA, R.R.; MURALIDHAR, R.M.; MARCHANT, R. e NIGAM, P. – Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution, **Molecular and Cellular Biochemistry**, 224, 159-168, 2001.

COSTA, G.L., PAZZETTO, R., BROL, F. e MATIOLI, G. Metodologia de seleção de cepas para a produção da ciclodextrina glicosiltransferase e para purificação da enzima. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 29, n. 1, 45-50, 2007.

Cucolo, G. R. et al. Seleção de Substratos para Produção de CGTase pelo *Bacillus* sp Subgrupo *alcalophilus* E16. In: XIX Simpósio Nacional de Fermentações, 7p. Florianópolis, 2003

CUCOLO, et al. Otimização da produção de CGTase de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 em polvilho doce em fermentação submersa. **Braz. J. Food Technol.**, v.9, n.3, p. 201-208, 2006.

CUCOLO, G. R.. Produção de ciclodextrinas a partir de amidos de diferentes fontes vegetais e seu emprego na inclusão molecular de aroma cítrico. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, p 119p. 2009

DAHLLÖF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.01, p.213-217, 2002.

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

DEMAIN, A.L. – Small bugs, big business: the economic power of the microbe, **Biotechnology Advances**, v.18, p. 499-514, 2002.

DEMAIN, A.L e ADRIO, J.L. Contributions of Microorganisms to Industrial Biology, **Molecular Biotechnology**, v. 38, p. 41-55, 2008.

DIAS, D. R. et al., Alkaline protease from *Bacillus* sp. Isolated from coffee bean grown on cheese whey. **World Journal of Microbiology and Biothechnology**. V. 24, p 2027-2034, 2008.

DIAS, w. a. Biotecnologia e biodiversidade no bioma cerrado: incursões reflexivas. **Ateliê Geográfico**. Edição especial. v. 1, n. 9, p.224-239, Goiás, 2010

DICKINSON, D.N.; DUC, M.T.L.; HASKINS, W.E.; GORNUSHKIN, I.; WINEFORDNER, J.D. e POWELL, D.H. Species differentiation of suite of *Bacillus* spores by mass spectrometry based protein profiling. **Applied and Environmental Microbiology**., v. 70, p. 475-482, 2004.

FENG, Y. Y., YANG, W. B., ONG, S. L., HU, J. Y. NG, W. J. Fermentation of Starch for Enhanced Alkaline Protease Production by Constructing an Alkalophilic *Bacillus pumilus* Strain, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n. 57, p. 153-160, 2001.

FERNANDES, A. F., Utilização da farinha de casca de batata na elaboração de pão integral. Dissertação de Mestrado. 127 p. Lavras: UFLA, 2006.

- FERNANDES, A., et al. Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum Tuberosum Lineu*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, p. 56-65, 2008.
- FERREIRA, V.F.; ROCHA, D.R.; SILVA, F.C. Potencialidades e Oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.
- FINLAY, B.J.; MABERLY, S.C.; COOPER, J.I. Microbial Diversity and Ecosystem Function. **Oikos**, v. 80, n. 2, p. 209-213, 1997.
- FORNARI, R, C, G. Aproveitamento do soro de queijo para a produção de goma xantana. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado)– Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul, 2006.
- GOMES, M. J. P. Gênero *Bacillus spp*. Veterinária da UFRGS Departamento de Microbiologia Clínica. 14p. 2008.
- GUEDES, F.L., et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos, **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89 n. 3, p. 220-225, 2008.
- Heldwein, A. B., et al .Saldo de radiação diurno em dosséis de batata como função da radiação solar global. **Revista Ciencia Agronomica**, Centro de Ciencias Agrarias - Universidade Federal do Ceara. v. 43, n. 1, p. 96-104, 2012
- HERMES, V. S.. Purificação e caracterização de Ciclodextrina Glicosiltransferase produzida por *Stenotrophomonas maltophilia*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.
- HIGUTI, I.H., et al. Studies on alkalophilic CGtase producing bacteria and effect of starch on cyclodextrin-glycosyltransferase activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n.1, p. 135-138, 2004.
- JAEGER, K.E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B.W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. MISSET, O. Bacterial Lipases, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.
- JEMLI, S; et al. A β -cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US132 strain: Purification, properties and potential use in bread-making. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 44-50, 2007
- JORGENSEN, P.L.; TANGNEY, M.; PEDERSEN, P.E.; HASTRUP, S.; DIDERICHSEN, B. JORGENSEN, S. Cloning and Sequencing of na Alkaline Protease Gene from *Bacillus lentus* and Amplification of the Gene on the *B. lentus* Chromosome by na Improved Technique, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 825-827, 2000.
- KANEKO et al., (1987), spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin-formim cyclodextrin glucanotransferase . J. Jpn Soc Starch Sci. p. v. 34, p. 45-48.
- KARIGAR, C.S.; RAO, S.S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. **Enzyme Research**, p. 1-11, 2011.
- KENNEDY, A. C.; GEWIN, V.L. Soil Microbial Diversity: Present and Future Considerations. **Soil Science**, v.162, n.09, p. 607-617, 1997.

KUHAD, R.C.; RISHI GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, p. 1-10, 2011.

KUO, C.C., et al. Production of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus sp* by pH-stat fed-batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n.11, p. 1723-1727, 2009.

KUTA, F. A.; NIMZING, L.; ORKA'A, P. Y. Screening of *Bacillus* species with potentials of antibiotics production. **Applied Medical Informatics**, (1-2), v. 24, p. 42-46, 2009.

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

LI, Zhaofeng. et al. γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 77, p. 245-255, 2007.

LOGAN, N. A.; DE VOUS, P. – *Bacillus* et Industrie, **Bulletin de la Société Française de Microbiologie**, v. 13, p. 130- 136, 1998.

LUENGO, R.F.A. et al. Tabela de composição nutricional das hortaliças. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

LYNCH, J.W. Biotecnologia do solo. São Paulo: Manole, 209 p., 1986.

MACEDO, O. F. L. de.. Preparação e caracterização de complexo de inclusão entre trimetopim e 2-hidroxiopropil-gama-ciclodextrina. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Sergiê. 60 p. São Cristóvão, 2010.

MAKELA, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO, J.; LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. **Journal Agric. Food Chem.** v. 36, p. 83-88, 1988.

MANZANO, M.; GIUSTO, C.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins. **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 259-264, 2009.

MARON, P.A; MOUGEL, C.; RANJARD, L. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. **Comptes Rendus Biologies**, v.334, n.5-6, p. 403-411, 2011.

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

MATIOLI, G.; MORIWAKI, C.; MAZZONI, R.B.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. Estudos dos parâmetros que influenciam a produção da enzima CGTase de *Bacillus firmus*, cepa n^o 37, **Acta Scientiarum**, v. 22 n. 2, p. 311-316, 2000.

MATTE, C. R. Imobilização covalente de ciclodextrina glicosiltransferase em microesferas de sílica-polietilenoglicol. Dissertação de Mestrado. Instituto de ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 64 p. Porto Alegre, 2011.

MENOCCHI, V., et al. Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus* sp. Strains isolated from Brazilian soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 682p. 2008,

MORIWAKI, C., et al. Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para produção de ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 32, N. 9, p. 2360-2366, 2009

NAESSENS, M.; VANDAMME, E.J. – Multiple forms of microbial enzymes, **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1119-1124, 2003.

NAKAMURA, N., HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glucanotransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. **Agric. Food Chem.**, v. 40, n. 5, p. 753-757, 1976.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v.54, p.655–670, 2003.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* CL7. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p.82-85, 2001.

NIU, D., et. al. High yield recombinant thermostable α -amilase production using an improved *Bacillus licheniformis* system. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 58, 2009.

OGAWA, J.; SOONG, C. L.; KISHINO, S.; LI, Q. S.; HORINOUCI, N. and SHIMIZU, S. – Screening and Industrial Application of Unique Microbial Reactions Involved in Nucleic Acid and Lipid Metabolisms. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n.3, p. 574-582, 2006.

OLIVEIRA, C. M. et al. Utilização do soro de leite bovino como revestimento protetor em morangos. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 187-196, 2008.

OLIVEIRA, D.M.; REIS, K.C. dos; PEREIRA, J. Composição centesimal da farinha de batata produzida a partir de secagem solar e secagem em estufa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: estratégia para o desenvolvimento. **Anais**. 19p. Recife, 2004.

OLIVEIRA, P. S. Aspectos relevantes da política de desenvolvimento da biotecnologia. **Revista eletrônica da Faculdade de direito da PUC-SP**. 32p, São Paulo, 2009.

PALLADINO, Fernanda. Estudo da síntese de enzimas por *Bacillus licheniformis* E-44 em meio formulado à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 2008. 75p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

PAVLOV, G.M., KORNEEVA, E.V., SMOLINA, N.A. e SCHUBERT, U.S. Hydrodynamic properties of cyclodextrin molecules in dilute solutions. **Eur. Biophys. J.**, v. 39, p. 371-379, 2010.

PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro de leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Braz. J. Food Technol**, Campinas, VII BMCFB, dez. 2008.

PELIZER, L.H.; PONTIEIRI, M.H. e MORAES, I.O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of technology of management & innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PENNA, J. B.; CANOLA, B. C. A evolução da biotecnologia e da engenharia genética frente às implicações ambientais, ao biodireito e aos direitos fundamentais. **R. Fac. Dir. UFG**, v. 33, n. 2, p. 74-88, 2009.

PETTIT, R.K. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v.4, n. 04, p. 471-478, 2011.

PINTO, F. S. T. Produção de ciclodextrina glicosiltransferase pela bactéria alcalófila *Bacillus circulans* ATCC 21783 cultivado em batelada, batelada alimentada e estado semi-sólido. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 71 p. 2007.

PY-DANIEL, K. R. Atividades amilolíticas identificadas em bibliotecas metagenômicas da microbiota do solo do Cerrado. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília – Instituto de Ciências Biológicas / Departamento de Biologia Celular. 118 p. Brasília, 2010.

RAMAKRISHNAA, et al. Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16 (5), p. 441-444, 1994.

REGINATO, E.; TEIXEIRA, M. L. Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de resíduos de pele suína na indústria alimentícia. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 81-86, 2009.

ROHLFES, A. L., et al. Indústrias Lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental. **TECNO-LÓGICA**, Santa Cruz do Sul, v.15, n.2, p.79-83, 2011

SACKHEIM, G. I.; LEHMAN, D. D. Química e Bioquímica para Ciências Biomédicas. São Paulo: Manole., 234 p., 2001.

SALES, A. E.; TAKAKI, G. M. de C.; ALVES DA SILVA, C. A. Avaliação da produção de bacitracina em diferentes temperaturas por *Bacillus licheniformis* (UCP 1016), utilizando meios alternativos contendo soro de leite. **Exacta**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 231-240, 2011.

SALVADOR, A. A.; et al. Biodiesel: aspectos gerais e produção enzimática. Dissertação de mestrado, p 18-19. Florianópolis, 2009.

SANCHEZ, S.; DEMAINE, A.L. – Metabolic regulation of fermentation processes, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 895-906, 2002.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. – Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

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

SIRTORI, L. R. Purificação e caracterização de uma bacteriocina produzida por *Bacillus sp*, P45. Dissertação (mestrado), 101p, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresearch Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

SMITH, O. Potatoes: production, storing, processing. Westport, Connecticut: The Avi, 1977. p.77-121.

SONDEGAARD, H.A.; GRUNERT, K.G.; SCHOLDERER, J. Consumer attitudy to enzymes in food production. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 466-474, 2005.

SORIANO, M.; BLANCO, A.; DÍAZ, P.; PASTOR, J. An unusual pectate lyase from a *Bacillus sp*. with high activity on pectin: cloning and characterization, **Microbiology**, v. 146, p. 89–95, 2000.

STAINER, R.Y. et al. The Microbial World. Ed. Prentice Hall Fth ed. P. 482-487, 1986.

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

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 8, p. 678-686, 1998.

THANGAM, E.B.; RAJKUMAR, G. S. Purification and Characterization of Alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*, **Biotechnology Applied and Biochemistry**, v. 35, p. 149-154, 2002.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p. 240-245, 2002

TYO, K.E.J.; KOCHARIN, K.; NIELSEN, J. Toward design-based engineering of industrial microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 1-8, 2010.

VALDUGA, E. et al. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 393- 400, 2006.

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 α -amylase family. **Journal of Biotechnology**. v. 94, p. 137-155, 2002.

VAN DER VEEN, B. A., et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1543, p. 336-360, 2000.

VENTURINI, et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quim. Nova**, v. 31, p. 360-368, 2008.

WACKETT, L.P. Microbial commercial enzymes. **Microbial Biotechnology**, v.4, n. 01, p. 548-556, 2011.

MORRILL, W. B. B., et al. Produção e nutrientes minerais de milho forrageiro e sorgo sudão adubado com soro de leite. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.16, n.2, p.182–188, 2012

WETLER-TONINI, R.M.C.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Degradação e Biorremediação de Compostos do Petróleo por Bactérias: Revisão. **Oecologia Australis**, v.14, n. 04, p.1010-1020, 2010.

YRKM, S.; SIVA KISHORE, N.; DATTATREYA, A.; ANAND, S.Y.; SRIDHARI, G. A Review on Biotechnology and Its Commercial and Industrial Applications. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v.1, n.7, p.1-5, 2011.

ZAVAREZE, E. R.; MORAES, K. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 100-105, 2010.

ZHANG, C.; BENNETT, G. N. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 600–618, 2005.

CAPÍTULO II

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por amostras de *Bacillus licheniformis* (UCP 1021) utilizando substratos agroindustriais

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por amostras de *Bacillus licheniformis* utilizando substratos agroindustriais

Paula Patrícia Borba^{1,3}, Rita de Cássia Freire Soares da Silva¹, Priscilla Ferreira Corrêa², Henrique Siqueira Amorim², Galba Maria de Campos Takaki^{1,3}, Carlos Alberto Alves da Silva^{1,3}.

¹UNICAP – Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais; ²Bolsista voluntário PIBIC – UNICAP; ³Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB). Universidade Católica de Pernambuco (R. Nunes Machado, 42 - Boa Vista- Recife- PE - 50050-590).

RESUMO

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, constituídos por um número variável de unidades de glicose, que se obtêm por ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19) sobre o amido. O gênero *Bacillus* é atualmente considerado como um dos maiores produtores de metabólitos secundários da biotecnologia microbiana, principalmente as enzimas. A preocupação com o meio ambiente leva à viabilização de projetos que favorecem a sustentabilidade do sistema de produção industrial, pois o setor industrial de alimentos produz uma série de resíduos de alto valor agregado que podem ser reutilizados na formulação de meios de produção de diversos produtos bioativos. Foram realizados ensaios de seleção de bactérias do gênero *Bacillus* produtores de CGTase utilizando 16 amostras, onde apenas o *Bacillus licheniformis* (UCP 1021) apresentou a formação de halos característicos em todas as condições testadas. Os ensaios referentes a produção da enzima foram realizados através da formulação de meios alternativos contendo a casca de batata (*Solanum tuberosum* L.) – em diferentes concentrações – e soro de leite, que ocorreram a 150rpm em shaker orbital, 37°C durante 84h. Foram avaliados o crescimento do microorganismo nos diferentes meios alternativos, a variação do pH e a determinação da atividade específica da CGTase. Os resultados obtidos evidenciaram que o microorganismo apresentou maior crescimento nos meios alternativos e a atividade específica de proteína foi maior no meio alternativo A₁ apresentando uma atividade enzimática de 0,823µmol/mg de CGTase, sendo a atividade enzimática qualitativa de 1,07U/mL e a concentração de proteínas totais 0,13mg/mL. A utilização de resíduos agroindustriais na formulação de meios alternativos para a produção de CGTase se mostrou eficaz e bastante promissora para futuros ensaios de otimização da produção enzimática.

Palavras-Chave: Ciclodextrina Glucosiltransferase; *Bacillus* sp.; Substratos alternativos agroindustriais.

ABSTRACT

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides consisting of a varying number of glucose units, which are obtained by action of the enzyme cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) on starch. The genus *Bacillus* is currently considered as one of the largest producers of secondary metabolites in microbial biotechnology, especially enzymes. The concern with the environment leads to the viability of projects that lead to sustainability of industrial production, because the food industry produces a lot of waste with high added value that can be reused in the development of means of production of various bioactive. Tests of selection of bacteria of the genus *Bacillus* CGTase producers using 16 samples, where only the *Bacillus licheniformis* (UCP 1021) showed the formation of characteristic halos in all conditions tested. The experiments concerning the production of the enzyme were carried through the formulation of alternative containing the potato skins (*Solanum tuberosum* L.) – different concentrations – and whey, which occurred in the orbital shaker at 150 rpm, 37°C for 84h. We evaluated the growth of microorganism in the different alternatives, the range of pH and determination of specific activity of CGTase. The results showed that microorganism highest growth in alternative means of protein and specific activity was higher under Alternative A1 showing an enzymatic activity of 0.823mol/mg of CGTase, and the qualitative enzyme activity of 1.07U/mL and Total protein concentration 0.13mg/mL. The use of agroindustrial residues in the formulation of alternative means for the production of CGTase was effective and promising for future trials optimization of enzyme production.

Keywords: cyclodextrin glucosyltransferase; *Bacillus* sp.; alternative substrates agribusiness

INTRODUÇÃO

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase; EC.2.4.1.19) é uma enzima que converte o amido em ciclodextrina (CD) através de reações de ciclização, acoplamento e desproporção (CUCOLO, 2009; MATTE, 2011).

As CDs são maltooligossacarídeos cíclicos não-redutores com 6 a 13 unidades de glicose ligadas entre si, por ligações glicosídicas α -1,4. As CDs mais comuns são do tipo α , β e γ , constituídas respectivamente por seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (VAN DER VEEN et al., 2000; KELLY, et al., 2008; MATTE 2011)

Quimicamente as CDs apresentam extremidades internas consideradas hidrofóbicas, e mais externamente 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, encapsulação de óleos essenciais e óleos voláteis, produtos agroquímicos, plásticos, produção de biocombustíveis e outras aplicações (ALLEGRE, DERATANI, 1994; BENDER, 1986; SZEJTLI, 2004; LOFTSSON, DUCHÊNE, 2007; SA BARRETO, CUNHA FILHO, 2008; MARQUES, 2010; FENG, ZHUANG, RAN, 2011).

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). O gênero *Bacillus* (SCHALLMEY, SINGH, WARD, 2004) é considerado um excelente produtor dessa classe de enzimas (PRAKASHAM et al., 2005; BONILHA et al., 2006; ALVES-PRADO et al., 2008; MENOCCI et al., 2008), mas outras classes de microorganismos também apresentam elevados índices de produção de CGTase em diferentes meios de produção (ABELYAN et al., 2002; GEETHA e MORE, 2010).

O gênero *Bacillus* é atualmente considerado como um dos maiores produtores de metabólitos secundários descrito na biotecnologia microbiana, apresentando diversas espécies encontradas na natureza. As CGTases são produzidas por microorganismos mesófilicos, termofílicos, alcalofílicos, halofílicos, e também a partir de termoactinomicetes. Dependendo do tipo de microorganismo utilizado diferentes tipos de CGTases são produzidas, levando à produção de diferentes tipos de CDs (AGUIAR, 2001; ABELYAN, et al., 2002; LI, et al., 2007; GUEDES et al., 2008; MENOCCI, et al., 2008; FERREIRA, ROCHA e SILVA et al., 2009; ATANASOVA et al., 2011).

A economia brasileira produz uma imensa quantidade de produtos agroindustriais, que geram enormes quantidades de resíduos agrícolas e agroindustriais. Estima-se que sejam gerados 100000 t/ano desses tipos de resíduos no Brasil, onde grande parte se acumulam e geram problemas devido aos descarte, acabando muitas

vezes se tornando um poluente ambiental (PANDEY et al., 2000; YANG et al., 2001;). Estudos têm sido realizados, visando a utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais como substratos para produção de ciclodextrinas, através da formulação de meios de produção considerados econômicos (VAN DER VEEN et al., 2000; CHAROENLAP et al., 2004; PINTO, 2007; RAMLI et al., 2010) visto que tais substratos são economicamente baratos e apresentam uma elevada concentração de nutrientes, além do que o seu reaproveitamento geraria menor impacto ao meio ambiente (PELIZER, PONTIEIRI e MORAES, 2007).

A batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) é considerada uma excelente fonte de nutrientes, pois a casca apresenta um teor de 45% de amido e apesar de possuir concentração menor em relação a polpa, ainda assim, pode ser empregada com eficiência na substituição de fontes de carbono em meios de produção de CGTase. Boa parte de outros nutrientes desse tubérculo concentram-se também na casca (FERNANDES et al., 2008).

O soro de leite tipo doce é resultado da fabricação de queijos, cuja composição química apresenta quantidades consideráveis de lactose, proteínas solúveis e sais minerais e por muito tempo foi classificado como resíduo de baixo ou nenhum valor comercial, sendo usado na alimentação de animais ou descartado em efluentes sem nenhum tratamento. Tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional, a legislação ambiental vem se tornando cada vez mais rígida e com isso as indústrias de laticínios procuram alternativas para aproveitamento desse rejeito. Dentre as técnicas de aproveitamento destaca-se a aplicação como substrato alternativo para fermentação (BARBOSA et al., 2010; MORRIL et al., 2012).

No presente trabalho foi realizado inicialmente a seleção de amostras de *Bacillus* isolados de solo contaminado por petróleo do porto da cidade do Recife – PE, com maior produção de CGTase, após a seleção de amostras com maior atividade enzimática, novos estudos foram realizados empregando substratos agroindustriais (casca de batata inglesa e soro de leite) para elaboração de meios alternativos e produção da CGTase.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismos

Foram utilizadas 16 linhagens de *Bacillus* sp, sendo 14 de *B. licheniformis* (UCPs 0893, 1008, 1009, 1012, 1013, 1014, 1016, 1017, 1019, 1021, 1022, 1025, 1026, 1033), 1

de *Bacillus* sp. (UCP 1010) e 1 de *B. subtilis* (UCP 0999), todas isoladas de ambientes contaminados por petróleo em diferentes temperaturas, que estão depositadas no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco, registrado no World Federation Culture for Collection-WFCC, sendo mantidas em meio Agar Nutritivo (AN) à 5°C.

Resíduos agroindustriais

Os substratos alternativos utilizados no cultivo em meio submerso para o crescimento celular e produção enzimática foram:

- Casca de batata (*Solanum tuberosum* L.) adquirida no comercio informal de batatas fritas, estas foram lavadas, moídas e congeladas para posterior uso;
- Soro de leite cedido por uma indústria de laticínios do interior do estado de Pernambuco.

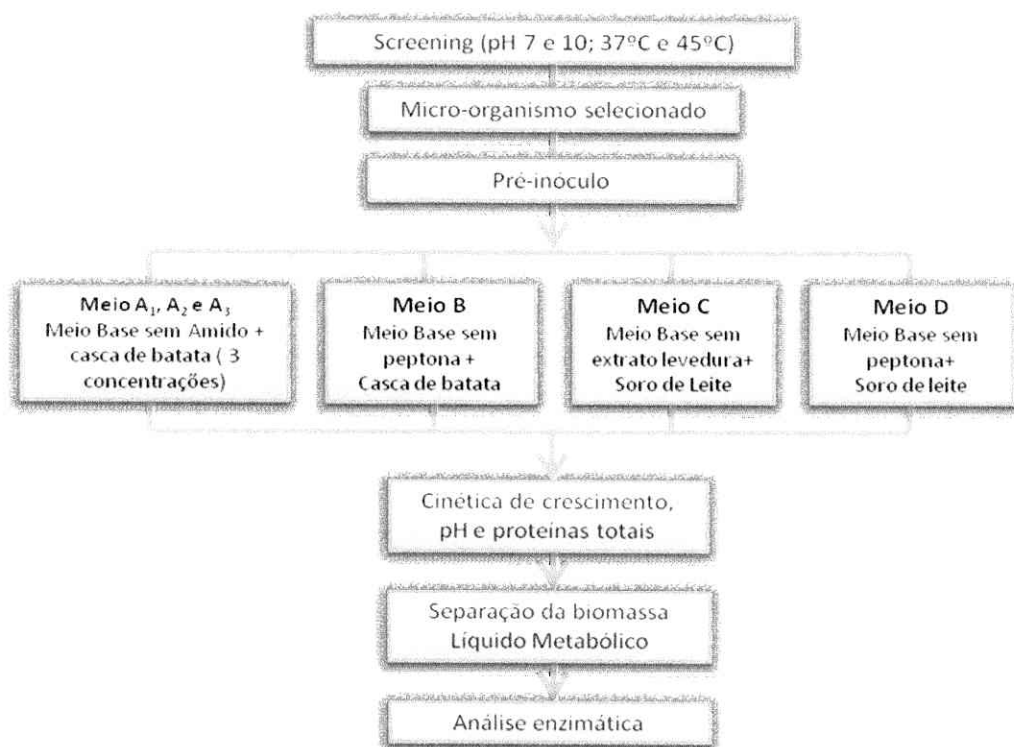


Figura 1 – Fluxograma Básico da metodologia

Seleção e detecção de produção de CGTase

Para a realização da seleção de amostras produtoras de CGTase foi utilizado o meio descrito por NAKAMURA e HORIKOSHI (1976), que apresenta composição g/L: 5,0

de extrato de levedura; 5,0 de peptona; 1,0 de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4); 0,2 de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$); 10,0 de amido solúvel; 10,0 de Na_2CO_3 (autoclavado separado); 20,0 g de ágar e 0,1g de corante vermelho do congo, pH 7,0 e 10,0. Após a solidificação do meio de seleção, foram feitos “poços” com 10mm de diâmetro no centro de cada placa. Amostras de 100 μ L da suspensão dos microorganismos foram inoculadas nos “poços”, e incubadas às temperaturas de 37°C e 45°C durante o período de 72 horas, com o acompanhamento diário. Foi esperado a formação de um halo claro em volta da colônia dos *Bacillus*, indicando a CGTase positiva

Manutenção do microorganismo

A amostra da colônia jovem do microorganismo selecionado (cultivo de 18h, 37°C) foi inoculada em caldo nutritivo e incubadas a 37°C por 16h sob agitação orbital de 150rpm. Posteriormente alíquotas foram retiradas para leitura da densidade ótica a 600nm, a leitura foi aproximadamente 1,0. Em seguida adicionou-se uma solução de glicerol (50%) a amostras do caldo contendo as células crescidas e logo congeladas a -5°C.

Pré-inóculo

O meio descrito por NAKAMURA e HORIKOSHI (1976) foi utilizado também como pré-inóculo, mas sem o Agar e o corante, este foi realizado em duplicata, sendo o pH ajustado após a autoclavagem, logo após foi inoculado uma alíquota de 1mL da amostra de *Bacillus* mantida em glicerol a 50%, e incubados a 37° num período de 18hs em agitação de 150rpm.

Produção de Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase)

O meio tradicional utilizado teve a mesma composição do pré-inóculo (Nakamura e Horikoshi, 1976) e com base nesta composição foram elaborados os meios alternativos que tiveram as seguintes substituições de substratos:

- **Meio A:** Constituído da mesma composição do meio controle, com substituição do amido solúvel pelo substrato alternativo farinha de casca de batata como fonte de carbono alternativa em concentrações diferentes de 2,5g/L, 5,0g/L e 10,0g/L, chamados de meios A1, A2 e A3 respectivamente;
- **Meio B:** Constituído da mesma composição do meio controle, com substituição da peptona por farinha de casca de batata na proporção de 10,0g/L;

- **Meio C:** Constituído da mesma composição do meio controle com substituição do extrato de levedura por soro de leite na proporção de 5,0g/L.
- **Meio D:** Constituído da mesma composição do meio controle com substituição da peptona por soro de leite na proporção de 5,0g/L.

Os testes foram realizados em duplicatas usando frascos de Erlenmeyers de 500mL contendo 250mL de meio de produção e cada um foi inoculado com 25mL do pré-inóculo (proporção de 10% (v/v)), sendo posteriormente submetido a agitação de 150rpm em shaker orbital a uma temperatura de 37°C por 84h. Durante o tempo de fermentação foram retiradas amostras do material fermentado em períodos determinados (4 em 4 horas). Todas as amostras foram centrifugadas a 10.000xg, por 15 minutos, sob refrigeração a 5°C. O sobrenadante foi utilizado para as análises enzimáticas.

Determinação da cinética de crescimento

A cinética de crescimento celular foi determinada a partir da turbidez das amostras dos meios, de onde retirou-se uma alíquota de 1mL para análise em espectrofotômetro a 600nm. Posteriormente os dados obtidos foram utilizados para expressar um gráfico no qual foi analisada a relação da atividade enzimática com o crescimento celular e o pH em tempos determinados (12 em 12h).

Determinação do pH

Os pHs de todas as amostras dos testes foram analisados por potenciometria.

Ensaio enzimático

A determinação da atividade enzimática foi realizada pelo método colorimétrico CD-fenolftaleína descrito por Makela et al., (1988) no qual após a centrifugação das amostras sob 10.000xg por 15 minutos, a 5°C, prepara-se uma solução trabalho constituída por 0,5mL de solução alcoólica de fenolftaleína (3mM), 0,5mL de tampão carbonato de sódio 0,6M, pH 10,5 e completa-se o volume de 25mL com água destilada.

Em reator termostaticado foram colocados 5,0 mL do caldo bruto (no qual supostamente estará presente a enzima) e, adicionado igual volume de solução de amido 1%, constituída de 0,1 g de amido solúvel; 1,0 mL de solução de CaCl₂ (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. A temperatura no reator foi mantida a 55°C e as amostras foram retiradas dos reatores em tempos pré-determinados de 0; 3; 6; 9 e 12 minutos, em seguida foram

inativadas à 100°C em água fervente durante cinco minutos e depois colocadas em banho a 28°C.

A quantidade de β -ciclodextrina foi determinada em função do tempo e pela diminuição da absorção a 550 nm, após a adição de 2,5 mL da solução de fenolftaleína a 0,5 mL das amostras inativadas, desta forma uma unidade de atividade (U) corresponde à quantidade de CGTase que produz 1 μ mol de β -CD/min/mL nas condições de reação, sendo a atividade específica expressa em unidades de atividade por miligrama de proteína (μ mol/mg proteína). Em comprimento de onda de 550nm, a coloração rosa da fenolftaleína em meio básico, possui uma maior absorbância. Para a curva de calibração foi utilizada uma solução de β -CD com concentração de 0,005-0,050 μ mol/mL em tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0.

Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteína foi determinada através do sistema colorimétrico de determinação de proteínas totais (LABTEST) que utiliza como padrão a albumina bovina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção do microorganismo

Para os ensaios de seleção dos melhores produtores da enzima CGTase foram utilizadas 16 linhagens de *Bacillus* sp. (1 de *Bacillus* sp., 14 de *B. licheniformis* e 1 de *B. subtilis*). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1. Foi observado que as amostras de *B. subtilis* (UCP 0999) e *Bacillus licheniformis* (UCP 1013, 1019, 1022, e 1026) não apresentaram a formação do halo característico da enzima testada, sendo essas amostras identificadas como CGTase negativa. A amostra de *B. licheniformis* (UCP 1021) demonstrou os melhores resultados apresentando halo significativo em todas as condições, revelando que é produtora de CGTase. As demais amostras de *Bacillus licheniformis* (UCPs 0893, 1008, 1009, 1012, 1014, 1016, 1017, 1025 e 1033) e a mostra de *Bacillus* sp. (UCP 1010) apresentaram halo mediano.

O método CD-fenolftaleína utilizado no presente estudo é apenas uma medida qualitativa indicativa da excreção da enzima CGTase. Portanto após a seleção do microorganismo com maior atividade de CGTase, o mesmo foi inoculado em meio submerso e alíquotas retiradas em tempos pré-determinados e foram analisadas por este

método descrito por MAKELA, et al., (1988), afim de obter resultados quantitativos quanto a produção da enzima.

Tabela 1 - Seleção de *Bacillus* produtores de CGTase em meio sólido em diferentes temperaturas (37°C e 45°C) e diferentes pHs (7,0 e 10).

Microorganismos	Condições		37°C		45°C	
	pH 7,0	pH 10	pH 7,0	pH 10	pH 7,0	pH 10
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 0893)	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillus subtilis</i> (UCP 0999)	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1008)	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1009)	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1012)	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1013)	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1014)	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1016)	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1017)	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1019)	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1021)*	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1022)	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1025)	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1026)	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1033)	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillus sp</i> (UCP 1010)	±	±	±	±	±	±

Nota: (+) halo significativo ($\cong 10\text{mm}$), (-) ausência de halo, (±) halo intermediário ($\cong 5\text{mm}$).

(*) Amostra utilizada na produção de CGTase.

O objetivo deste experimento foi constatar se as culturas de *Bacillus sp.* estocadas eram capazes de produzir halo em meio de cultura contido em placa de Petri, indicando CGTase positiva. A seleção de cepas produtoras de CGTase é mais rápida detectando a atividade da enzima em meio sólido, por meio da formação de halos. Esta técnica tem o objetivo de isolar e selecionar microorganismos que produzem altas concentrações de CDs com maior seletividade. Concluída a ativação da cultura, uma amostra de *B. licheniformis* (UCP 1021) foi utilizada para a produção enzimática, sendo cultivada em meio submerso Nakamura e Horikoshi (1976) modificado, substituindo substratos comerciais (amido, extrato de levedura e peptona) por substratos agroindustriais (casca de batata e soro de leite).

Abd-aziz et al., (2007) selecionaram bactérias produtoras de CGTase em meio sólido, sendo a atividade da CGTase verificada pela formação de halos claros ao redor das colônias apresentando 0,5-3,5 cm após crescimento a 37°C em 24h. Após seleção, a amostra selecionada foi inoculada em meios de produção com diferentes fontes de amido como fontes de carbono.

Alves-Prado et al., 2002, realizaram isolamento de 80 linhagens de bactérias alcalófilas, sendo identificadas como do gênero *Bacillus*, que apresentaram atividade de CGTase positiva, sendo que 14 delas apresentaram crescimento a 45°C e as demais cresceram a 37°C, sendo as 4 melhores linhagens produtoras de CGTase classificadas como mesófilas e incluídas no subgrupo *alcalophilus*.

Bonilha et al., (2006) isolaram e identificaram cepas de *Bacillus licheniformis* alcalófilos e inocularam um pré-cultivo na proporção 10% nos meios de produção com diferentes fontes de carbono, pH e concentrações de cloreto de sódio. Também testaram o caldo nutriente (NB), contendo fécula de batata. Os resultados da análise qualitativa nas placas com fécula de batata, amido de mandioca e amilopectina mostrou que culturas produziu halo confirmando a presença de atividade CGTase, no entanto, na placa onde amilose foi usada como substrato, a formação do halo foi muito discreta. Observaram ainda que os halos permaneceram ativos indicando que não foi perdida a capacidade de produzir a atividade CGTase, este fato também foi observado no presente estudo ao utilizar casca de batata como fonte de amido.

Cinética de produção enzimática relacionada a cinética de crescimento do *Bacillus licheniformis* (UCP 1021) e pH nos meios tradicional e alternativos.

Após a seleção da amostra com melhor atividade de produção da CGTase, foram iniciados os estudos da cinética de produção, envolvendo ensaios em meios tradicional e alternativos. Na figura 2 verifica-se que o microorganismo testado no meio tradicional, apresentou uma atividade enzimática máxima de 1,01 U/mL as 48 h, pH 7,64.

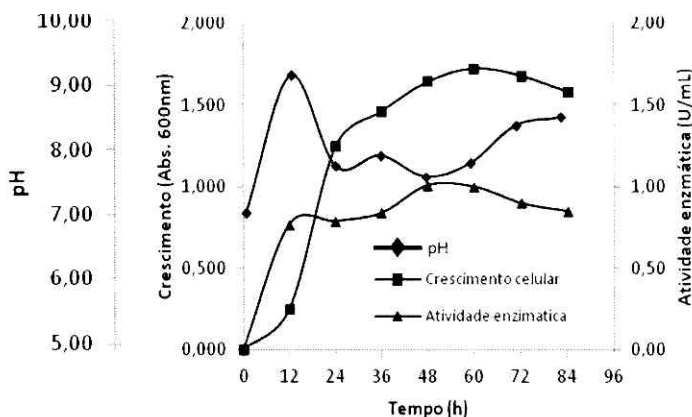


Figura 2 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio tradicional.

No meio alternativo A1, onde houve substituição do amido por 2,5g/L de casca de batata, foi observado uma atividade máxima de 1,07 U/mL as 12h, pH 7,13, conforme pode ser visto na figura 3. As fases da curva de crescimento celular neste meio ocorreram de forma similar ao observado no meio tradicional, salvo sob um crescimento mais acentuado nas primeiras horas da fase exponencial.

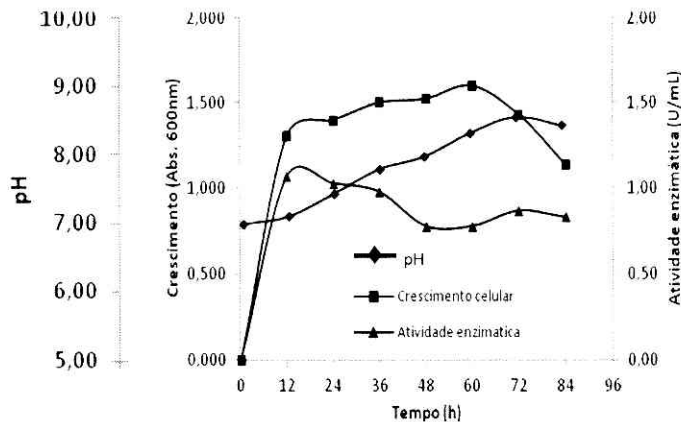


Figura 3 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo A1.

No teste realizado em meio alternativo A2 com substituição do amido por 5g/L de casca de batata (figura 4), a atividade enzimática máxima de 1,43 U/mL ocorreu em 24h, pH 7,46, também durante a fase exponencial como foi observado nos meios tradicional e alternativo A1. Cinética de crescimento observada neste meio apresentou fases bem semelhantes ao meio A1.

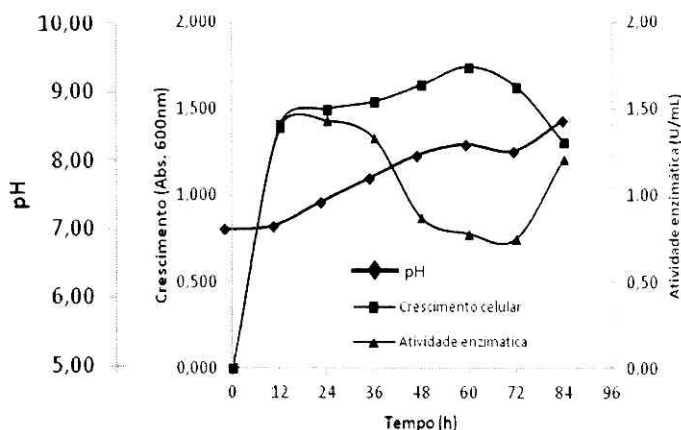


Figura 4 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo A2.

Para o meio A3, onde houve substituição de amido por 10,0g/L de casca de batata (figura 5), foi constatado uma atividade enzimática máxima de 1,41 U/mL só em

84h, pH9,02, no entanto, no mesmo teste foi observado que com 36h houve atividade enzimática de 1,29U/mL, pH 8,4 (figura 5).

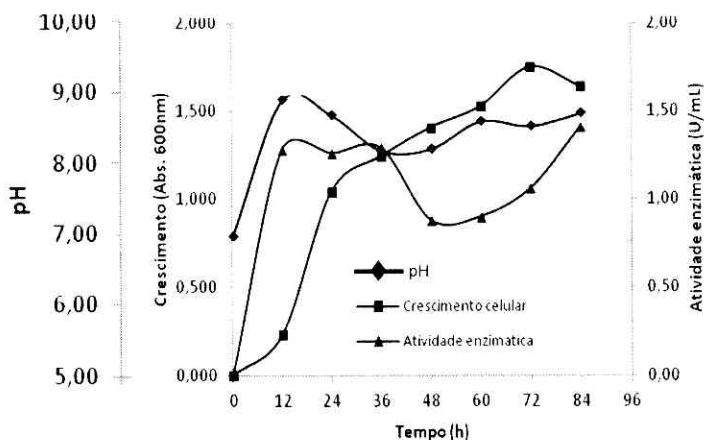


Figura 5 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo A3

Na cinética de crescimento observada nos meios alternativos A1, A2 e A3, houve similaridade em relação ao término da fase logarítmica e início da fase estacionária, apresentando picos máximos em 60h (meios A1 e A2) 72h (meio A3), exceto nas primeiras 24h onde o crescimento foi mais acentuado nos meios A1 e A2, ou seja, todos apresentaram longas fases exponenciais. Neste sentido, foi possível constatar que esses meios alternativos são muito favoráveis ao crescimento celular, principalmente os meios A1 e A2, que apresentaram atividade específica máxima em 12 horas, como será mostrado e discutido sob o próximo subtítulo.

O crescimento no meio B, onde houve substituição da peptona por casca de batata (10,0g/L), em relação ao meio tradicional também foi significativo, tendo apresentado crescimento similar aos meios A1 e A2, bem acentuado nas primeiras 12h onde ocorreu a atividade máxima da enzima de 1,78 U/mL, pH 7,0 (figura 6).

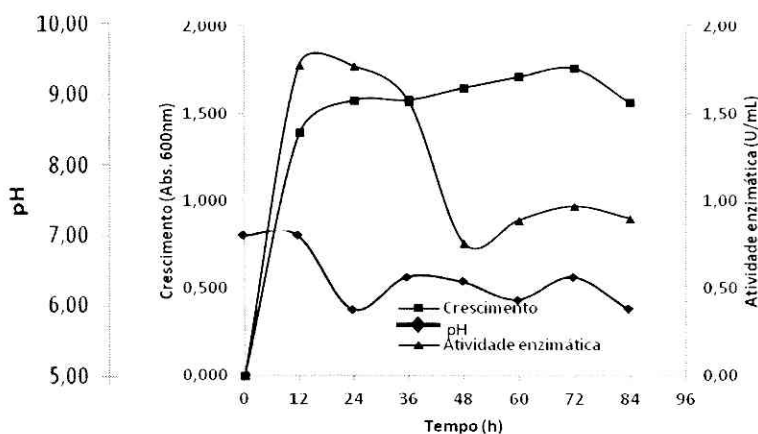


Figura 6 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo B.

O crescimento no meio C, onde houve substituição do extrato de levedura por soro de leite, manteve-se significativamente mais alto em relação a todos os outros testes (alternativos e tradicional) durante todo o tempo, tendo ocorrido ponto mais alto no período de 72h-80h, no entanto, a atividade máxima da enzima foi de 1,82 U/mL, em 12h, pH 5,45 (figura 7).

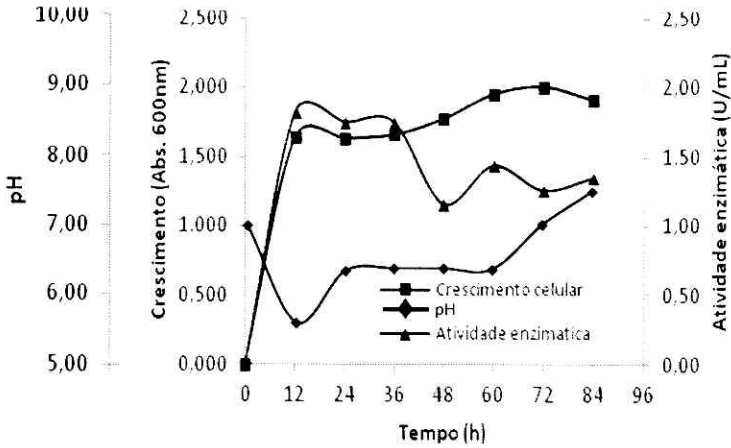


Figura 7 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo C.

No meio D, onde houve substituição da peptona por soro de leite, o crescimento esteve acima do meio tradicional durante boa parte do tempo, neste meio alternativo, a máxima atividade enzimática foi de 1,97 U/mL as 36h, pH 6,48 (Figura 8). Tanto o Meio C quanto o meio D (figura 7 e 8 respectivamente) apresentaram uma breve fase lag e uma extensa fase exponencial, como foi visto também nos meio A1 e A2 (figura 1) prolongando-se no restante do tempo (84h).

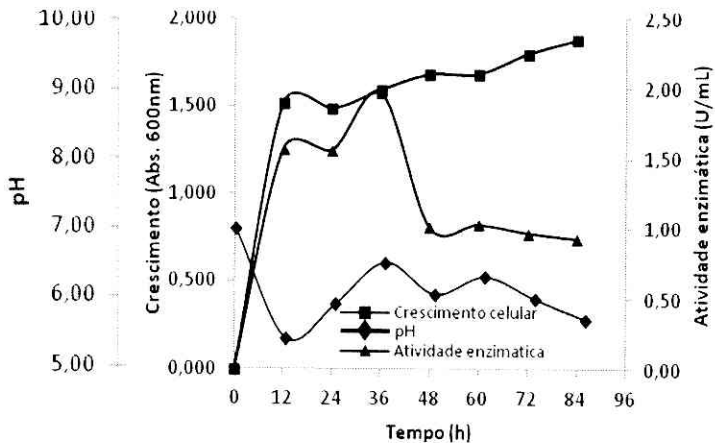


Figura 8 – Determinação da curva de crescimento, pH e atividade enzimática no meio alternativo D

Foi possível observar que no meio tradicional a máxima foi de 1,00U/mL em 48h, enquanto que houve melhores índices observados nas primeiras 12 horas de fermentação

nos meios A₁, A₃, B e C com 1,07 U/mL, 1,28 U/mL, 1,78 U/mL, 1,82 U/mL, respectivamente. Nos meios A₂ e D em tempos maiores (24h e 36h, respectivamente) apresentaram AE máxima de 1,43 U/mL e 1,97U/mL. Muito embora a cinética de crescimento tenha apresentado fase logarítmica prolongada. De forma geral, houve um bom crescimento do microorganismo selecionado em todos os meios alternativos comparado ao meio tradicional e todos os testes apresentaram ponto máximo de atividade enzimática durante a fase exponencial.

Com relação ao comportamento do pH nos ensaios, apesar do pH inicial neutro, todos tenderam a alcalinizar rapidamente nas primeiras 12h. Os meios A1, A2 e A3 se mantiveram na faixa de 7,85 a 9,46 (figuras 3, 4 e 5), semelhante ao meio controle que se manteve na faixa de 7,64 a 9,43 (figura 2). Nos meios B, C e D o pH se manteve na faixa de 7,0 a 5,32 na maior parte do tempo muito embora tenham também alcalinizado nas primeiras 12h de fermentação chegando ao pH de 8,07 (Meio B), 7,80 (meio C) e 7,47(Meio D) como pode ser observado nas figuras (5, 6 e 7).

Hermes (2010), em estudos de produção de CGTase por uma nova bactéria isolada, a *Stenotrophomonas maltophilia*, constatou que a temperatura ótima para a atividade da enzima foi de 60°C, enquanto que a atividade da enzimática permaneceu praticamente estável entre pH 6 e 10, indicando natureza alcalotolerante. Neste sentido observa-se mais uma vantagem nos resultados aqui apresentados pois todos os meios foram submetidos a uma temperatura de 37°C que é inferior a utilizada pelo pesquisador supracitado, o que significa custos mais baixos para a produção, no entanto podem apresentar pouca estabilidade térmica.

Foi constatado no presente estudo que os meios alternativos apresentaram bons resultados referente a atividade enzimática, tendo em vista que a concentração expressa $\mu\text{mol de } \beta\text{-CD /min x mL}$ foi de 0,83-1,07U/mL (para o meio A1), 0,75-1,43U/mL (para o meu A2), 0,88-1,41 U/mL (para o meio A3), 0,76-1,78 U/mL (para o meio B), 1,16-1,82 U/mL (para o meio C), e 0,93-197 U/mL (para o meio D), em contrapartida o meio controle (baseado no meio de Nakamura e Horikoshi, 1976) apresentou atividade de 0,77-1,01 U/mL.

Assim como nos ensaio realizados, Matioli et al., (2000), realizaram fermentação com bactérias do gênero *Bacillus* a 37°C sob agitação de 150rpm, e também constataram que a enzima foi produzida na fase exponencial do crescimento celular, sendo que a máxima produtividade só foi atingida após 72h de fermentação com 0,186 $\mu\text{mol de } \beta\text{-CD}$

/min x mL. Ressaltando assim que a maior atividade enzimática observada foi obtida do ensaio que recebeu inoculo de absorbância igual a 1,0 no período de 72h e após este período, a maior atividade enzimática foi obtida do ensaio que recebeu inoculo com absorbância igual a 0,5.

Makela et al., (1988), durante um estudo de produção de CGTase observaram que durante o crescimento do *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* a liberação da enzima no meio de cultivo foi ativada desde o início do crescimento, atingindo 65% da sua produção na transição da fase exponencial para a estacionária, sendo o restante da produção liberada na fase de declínio, provavelmente devido a liberação da CGTase intracelular devido a lise das células.

Blanco, (2009), estudou a presença cultivou *Bacillus* sp subgrupo *alkalophilus* no meio NAKAMURA e HORIKOSHI modificado, utilizando diferentes concentrações de polvilho, fontes de nitrogênio e Na_2CO_3 , o resultado da atividade enzimática de suas amostras variou de 4,0 U/mL (em 24h) para 96,1 U/mL (72h). Os estudos de Blanco, (2009), indicaram que a atividade enzimática aumentou até 72h de fermentação e por este motivo realizou ensaios em 96h de fermentação, concluindo então que não houve aumento significativo com o aumento do tempo de fermentação de 72 para 96h.

Em estudos realizados por Bonilha et al., 2006, uma amostra de *Bacillus* alcalofílico, isolada de amostras de cascas de mandioca, depois identificada como *Bacillus licheniformis*, tendo ocorrido a melhor produção de CGTase por esta cepa ao utilizar amido de batata como fonte de carbono. Também obtiveram bons resultados utilizando amido de mandioca e amilopectina.

Prakashan et al., (2005), estudaram a produção de CGTase por *Bacillus circulans* e *Bacillus cereus* em meios contendo amido 1,5% e observaram que a atividade de CGTase ocorreu durante a fase exponencial do crescimento microbiano. Os pesquisadores observaram também a influencia da quantidade do inoculo nas proporções de 2, 4, 6 e 8% (v/v) e constataram que o inóculo de 8% contribuiu para uma atividade maior da enzima tanto para o *Bacillus cereus* com mais de 12000 U/mL, quanto para o *Bacillus circulans* com quase 8000 U/mL. No presente trabalho foi utilizado um inoculo de 10%.

Atividade específica de CGTase

Os resultados obtidos de atividade enzimática e de proteínas totais foram utilizados para calcular a atividade enzimática específica (AEE). Sendo feito o calculo da seguinte forma: $AE / PT = AEP$. Onde AE é atividade específica, PT é a concentração de proteínas totais e AEE representa a a atividade enzimática específica.

Conforme o obsevado na tabela 2, todos os testes apresentaram AEE acima do obtido com o meio controle, (0,120 μ mol/mg, 24h), além disso, com exceção do meio D que só apresentou máxima AEE em 36h, os demais apresentaram em tempo mais curto de 12h. A substituição da fonte de carbono (amido) por casca de batata na proporção de 2,5g/L (meio A₁) promoveu a melhor AEE de todos os testes (0,823 μ mol/mg), seguido das proporções de 5,0g/L e 10,0g/L (meios A₂ e A₃ respectivamente) com AEE de 0,228 μ mol/mg e 0,191 μ mol/mg, respectivamente. Por ultimo os meios B (0,171 μ mol/mg,12h), C (0,141 μ mol/mg, 12h) e D (0,149 μ mol/mg, 36h).

Tabela 2 - Atividade específica de proteínas (CGTase) em meios alternativos

Meios	pH final	Atividade enzimática U/mL	Proteínas Totais mg/mL	Atividade específica de CGTase (μ mol/mg)
Tradicional	8,67	0,79	0,66	0,120
A1	8,69	1,07	0,13	0,823
A2	8,81	1,39	0,61	0,228
A3	9,02	1,28	0,67	0,191
B	5,95	1,78	1,04	0,171
C	7,53	1,82	1,29	0,141
D	5,61	1,97	1,32	0,149

Nota: (Tradicional) - Nakamura e Horikoshi, (A1) - substituindo amido por casca de batata(2,5g/L), (A2) - substituindo amido por casca de batata (5g/L), (A3) - substituindo amido por casca de batata (10g/L), (B) - substituindo peptona por casca de batata (10g/L), (C) - substituindo extrato de levedura por soro de leite (5g/L), (D) substituindo peptona por soro de leite (5g/L).

Ao atingir a melhor atividade específica o pH manteve-se próximo a neutralidade, no entanto observa-se que houve alcalinização do meio ao longo do tempo. Estas informações confirmam a natureza alcalófila do microorganismo. Outra informação relevante é a de que os melhores índices de atividade específica de proteína ocorreu exatamente nas primeiras 12h, confirmando que não é necessário pH 9,0-10,0 para a produção da CGTase.

Estes resultados mostram que uma alternativa para minimizar os custos de produção da CGTase, se encontra na substituição do amido, da peptona e do extrato de levedura, que possuem um alto custo comercial, por substratos agroindustriais como fontes alternativas.

Comparando os estudos realizados com o meio tradicional descrito por Nakamura e Horikoshi, (1976), observa-se que a atividade enzimática da CGTase foi aumentada de 6,9 vezes.

A atividade enzimática utilizando substrato amido de casca de batata quando comparada aos resultados de Bonilha et al., (2006), utilizando o mesmo substrato observa-se que:

- No meio A1: a atividade enzimática foi 43,3 vezes maior;
- No meio A2: a atividade enzimática foi 17,8 vezes maior;
- No meio A3: a atividade enzimática foi 14,8 vezes maior.

Estes resultados demonstram a eficiência da utilização do substrato casca de batata para produção da CGTase.

- A utilização do substrato soro de leite como substituinte do extrato de levedura na produção de CGTase, demonstrou um aumento de 11,8 vezes a atividade enzimática encontrada por Bonilha et al., (2006);
- A atividade da CGTase produzida com substrato soro de leite foi de 1,24 vezes maior, quando comparada ao meio descrito por Nakamura e Horikoshi, (1976);
- Este resultado demonstra um caráter inovador, pois até o momento não há registros na literatura de produção de CGTase utilizando soro de leite como substrato.

Matioli et al., (2000), ao realizar fermentação com espécie do gênero *Bacillus*, por 144h a 37°C sob agitação de 150rpm, observaram que o maior teor de proteínas foi obtido no ensaio que recebeu inóculo com turbidez igual de 0,5 a 1.0. Já no presente estudo a turbidez dos inóculos utilizados igual a 1.0.

Menocci et al., (2008), cultivaram três linhagens de *Bacillus sp.* isoladas de amostras de solo aderido a casca de mandioca. Os pesquisadores utilizaram amido de batata, amido de mandioca, maltodextrina e glicose como fontes de carbono em

temperaturas que variaram de 25°C a 55°C. Os três microorganismos apresentaram maior atividade específica de CGTase quando cultivados com amido de batata a 40°C, sendo que em relação a atividade específica de CGTase, em pH 7,0 só dois isolados apresentaram $4,0 \times 10^{-3}$ e $2,2 \times 10^{-3}$ U/mg prot, respectivamente. Neste mesmo pH o terceiro isolado apresentou atividade específica de $2,4 \times 10^{-3}$ U/mg proteína, porém, em pH 10,0 sua atividade específica foi de $3,4 \times 10^{-3}$ U/mg prot.

Bonilha et al., (2006), obtiveram uma atividade específica de CGTase máxima de 65% utilizando filtrado de culturas contendo fécula de batata, mandioca e amilopectina como substrato. Este resultado confirma a análise qualitativa realizada descrita anteriormente, no entanto, a atividade para o amido de batata mais cultura de glicose foi de 25%, indicando que a glicose inibe a síntese enzimática

Os resultados obtidos na seleção de microorganismos produtores de CGTase evidenciou que as amostras de *Bacillus subtilis* (UCP 0999) e *Bacillus licheniformis* (UCPs 1013, 1019, 1022, e 1026) não apresentaram a formação do halo característico da enzima testada, sendo essas amostras identificadas como CGTase negativa enquanto que a amostra de *Bacillus licheniformis* (UCP 1021) apresentou halos em todas as condições, revelando assim que a amostra é uma boa produtora de CGTase. As demais amostras de *Bacillus licheniformis* (UCPs 0893, 1008, 1009, 1012, 1014, 1016, 1017, 1025 e 1033) e a mostra de *Bacillus sp.* (UCP 1010) apresentaram halo mediano.

Todos os testes apresentaram AEE acima do obtido com o meio controle, (0,120µmol/mg, 24h), além disso, com exceção do meio D que só apresentou máxima AEE em 36h, os demais apresentaram em tempo mais curto de 12h. A substituição da fonte de carbono (amido) por casca de batata na proporção de 2,5g/L (meio A₁) promoveu a melhor AEE de todos os testes (0,823µmol/mg), seguido das proporções de 5,0g/L e 10,0g/L (meios A₂ e A₃ respectivamente) com AEE de 0,228 µmol/mg e 0,191 µmol/mg, respectivamente. Por ultimo os meios B (0,171µmol/mg, 12h), C (0,141µmol/mg, 12h) e D (0,149µmol/mg, 36h).

Referências Bibliográficas

- ABD-AIZ, S.; NOI, S. A.; HASSAN, O.; KARIM, M. I. A.; ALITHEEN, N. B.; KAMARUDDIN, K.; ILLIAS, R. MD. **Malays app Biol.** v.36 n. 2, p. 1-5, 2007.
- ABELYAN, V.A.; BALAYAN, A.M.; MANUKYAN, L.S.; AFYAN, K.B.; MELIKSETYAN, V.S.; ANDREASYAN, N.A.; MARKOSYAN, A.A. Characteristics of cyclodextrin production using cyclodextrin glucanotransferases from various groups of microorganisms. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.38, n.06, p.527-535, 2002.

AGUIAR, Cláudio L.. Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. **B.CEPPA**, v. 19, n. 1, p. 119-138, 2001.

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

ATANASOVA N, KITAYSKA D, BOJADJIEVA I, YANKOV D, TONKOVA A A novel cyclodextrin glucoamyltransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. **Process Biochemistry**, v.46, n 01, p.116-122, 2011

BENDER, H. Production, characterization, and application of cyclodextrins. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 6, p. 31-7, 1986.

BINER, A., ANTRANIKAM, G. e HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v 59, p. 609-617, 2002.

BONILHA, P. R. M.; MENOCCI, V; GOULART, A. J.; POLIZELI, M. de L. T. de M.; MONTI, R.. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 317-323, 2006.

CARNEIRO, A.J.J, ALVES-PRADO, H.F., GOMES, E. e DA SILVA, R. Escurecimento enzimático em alimentos: ciclodextrinas como agentes antiescurecimento, **Alim. Nutr.**, v. 17, n.3, p. 345-352, 2006.

CHAROENLAP, N., DHARMSTHITI, S., SIRISANSANEEYAKUL, S., LERTSIRI, S. Optimization of cyclodextrin production from sago starch. **Bioresource Technology**, v. 92, p.49–54, 2004.

CUCOLO, G. R.. **Produção de ciclodextrinas a partir de amidos de diferentes fontes vegetais e seu emprego na inclusão molecular de aroma cítrico**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, p 119p. 2009.

FENG, T.; ZHUANG, H.; RAN, Y. The application of cyclodextrin glycosyltransferase in biological science. **Journal Bioequivalence Available**, v.3, n.9, p.202-206, 2011.

FERNANDES, A. F.; PEREIRA, J.; GERMANI R.; OIANO-NETO, J. Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum Tuberosum Lineu*). **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 28, p. 56-65, 2008.

FERREIRA,V.F., ROCHA,D.R., E, SILVA,F.C. **Potencialidades e Oportunidades na química da sacarose e outros açúcares**. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 623-638, 2009.

GUEDES, F.L., CAVALCANTI ALVES, G.M., SANTOS, F.L.A., LIMA, L.F., ROLIM, L.A. e ROLIM NETO, P.J. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos, **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n.3, p. 220-225, 2008.

LI , Zhaofeng. et al.. γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 77, p. 245-255, 2007.

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

MARQUES, H.M.C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 25, p.313-326, 2010.

MATTE, C. R.. Imobilização covalente de ciclodextrina glicosiltransferase em microesferas de sílica-polietilenoglicol. Dissertação de Mestrado. Instituto de ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 64 p. Porto Alegre, 2011.

MENOCCHI, V. et al. Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus* sp. strains isolated from brazilian soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 682 p.. 2008.

MORIWAKI, Cristiane, et al. Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para produção de ciclodextrinas. **Quimica Nova**, v. 32, N. 9, p. 2360-2366, 2009.

NAKAMURA, N., HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glucoamyltransferase- producing alkalophilic *Bacillus* sp. **Agric. Food Chem.**, v. 40, n. 5, p. 753-757, 1976.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153-162, 2000.

PRAKASHAM, R.S.; RAO, R.S.; RAO, C.S.; SARMA, P.N. Cyclodextrin glycosil transferases from *Bacillus circulance* and *Bacillus sp.* **Indian Journal of Biotechnology**, v.4, p.347-352, 2005.

REGINATO, E.; TEIXEIRA, M. L. Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de resíduos de pele suína na indústria alimentícia. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, n. 1, p. 81-86, 2009.

SA BARRETO, L. C. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Ciclodextrina: importante excipiente farmacêutico funcional, **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n. 4, p.629-636, 2008.

SONDEGAARD, H.A., GRUNERT, K.G. e SCHOLDERER, J. Consumer attitudy to enzymes in food production. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p. 466-474, 2005.

SZEJTLI, J. Past, Present and future of cyclodextrin research, **Pure Applied Chemistry**, v.76, p.1825–1845, 2004.

TYO, K.E.J., KOCHARIN, K. e NIELSEN, J. Toward design-based engineering of industrial microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 1-8, 2010.

VAN DER VEEN, B. A., et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1543, p. 336-360, 2000.

VAN DER VEEN, B.; UIDEHAAG, 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, J.H., LIN, H.C., MAU, J.L., Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, v.72, p.465–471, 2001.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos evidenciaram que:

- ✚ Amostras de *Bacillus subtilis* (UCP 0999) e *Bacillus licheniformis* (UCPs 1013, 1019, 1022, e 1026) não apresentaram a formação do halo característico da enzima testada, sendo essas amostras identificadas como CGTase negativa;
- ✚ Amostra de *Bacillus licheniformis* (UCP 1021) demonstra ser produtora de CGTase pois apresenta halo característico em todas as condições;
- ✚ A atividade enzimática máxima obtida no meio tradicional ocorre com 48h de fermentação;
- ✚ Verifica-se uma maior atividade enzimática específica em todos os meios alternativos testados, quando comparado ao meio tradicional.
- ✚ Observa-se que a produção da CGTase em todos os meios testados, ocorre na fase logarítmica de crescimento;
- ✚ A enzima CGTase é produzida em todos os meios alternativos utilizados, destacando-se o meio A1 com maior atividade específica obtida;
- ✚ A utilização de substratos agroindustriais tem se tornado uma fonte promissora na formulação de meios alternativos para a produção de enzimas microbianas.

ANEXOS

Instruções da Revista **Brazilian Archives of Biology and Technology**

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Submission of papers: *Brazilian Archives of Biology and Technology* publishes original research papers, Short notes and Review articles in English in the interdisciplinary areas of biological sciences and engineering/technology. Submission of paper implies that it has not been published or being considered for publication elsewhere. Care should be taken to prepare a compact manuscript with precision in presentation, which will help authors in its acceptance. All the papers are subjected to review by referees.

Manuscript: Three copies of the single-spaced typed manuscript (maximum 12 pages for original and review articles and 2-4 pages for short notes) on a high grade A-4 size paper (210x297 mm), with margins (left 25, right 20, superior and inferior 30 mm) should be prepared. This should be divided under the following headings: ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS, RESUMO, REFERENCES. These headings should be typed in bold upper case (12 font). For review articles, authors should make their own headings along with Abstract and Introduction.

Title: The title (18 font, bold) of the paper should clearly reflect its contents. It should be followed by the name(s) of author(s) with expanded initials (12 font, bold) and the address(s) (*italic*, 10 font) of the institution(s) where the work has been carried out.

ABSTRACT: Each paper should be provided with an abstract (*italic*) of 100-150 words, describing briefly on the purpose and results of the study. It should be prepared as concisely as possible.

Key words: Authors should provide three to six key words that will be used in indexing their paper.

INTRODUCTION: This should describe the background and relevant information about the work. It should also state the objective of the work.

MATERIALS AND METHODS: Authors must take care in providing sufficient details so that others can repeat the work. Standard procedures need not be described in detail.

RESULTS AND DISCUSSION: Results and Discussion may be presented separately or in combined form (authors may decide easier way for them). Preliminary work or less relevant results are not to be described. The reproducibility of the results, including the number of times the experiment was conducted and the number of replicate samples should be stated clearly.

RESUMO: An abstract of the paper should also be prepared in Portuguese and placed before the list of References. Authors from other than Latin American countries can seek the help of Editor's office to prepare Portuguese resumo of their papers.

REFERENCES: References in the text should be cited at the appropriate point by the name(s) of the author(s) and year (e.g. Raimbault & Roussos, 1996; Raimbault *et al.*, 1997). A list of references, in the alphabetic order (10 font), should appear at the end of the manuscript. All references in the list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished results should not be included in the list. Examples of references are given below.

In journals:

Pandey, A. (1992), Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem.*, **27**, 109-117.

Thesis:

Chang, C. W. (1975), Effect of fluoride pollution on plants and cattle. PhD Thesis, Banaras Hindu University, Varanasi, India.

In books:

Tengerdy, R. P. (1998), Solid substrate fermentation for enzyme production. In-*Advances in Biotechnology*, ed. A. Pandey. Educational Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13-16.

Pandey, A. (1998), *Threads of Life*. National Institute of Science Communication, New Delhi. *In conferences:*

Davison, A. W. (1982), Uptake, transport and accumulation of soil and airborne fluorides by vegetation. Paper presented at 6th International Fluoride Symposium, 1-3 May, Logan, Utah.

Tables and Figures: Tables and figures, numbered consecutively with arabic numerals must be inserted at appropriate place in the text. These should be used to present only those data, which can not be described in the text.

Units and Abbreviations: The SI system should be used for all experimental data. In case other units are used, these should be added in parentheses. Only standard abbreviations for the units should be used. Full stop should not be included in the abbreviation (e.g. m, not m. or rpm, not r.p.m.). Authors should use '%' and '/' in place of 'per cent' and 'per'.

Manuscript lay-out: It is suggested that authors consult a recent issue of the journal for the style and layout. Except the title, abstract and key words, entire text should be placed in two columns on each page. Footnotes, except on first page indicating the corresponding author (8 font) should not be included. The entire manuscript should be prepared in Times New Roman, 11 font (except reference list, which should be in 10 font).

Spacing: Leave one space between the title of the paper and the name(s) of the author(s), and between the headings and the text. No space should be left between the paragraphs in the text. Leave 0.6-cm space between the two columns.

Electronic submission: Manuscript should be accompanied by a diskette indicating the name and version of the word processing programme used (use only MS Word 6/7 or compatible).

Referees: When submitting the manuscript authors may suggest up to three referees, preferably from other than their own countries, providing full name and address with email. However, the final choice of referees will remain entirely with the Editor.

Page charges and reprints: There will be no page charges. Reprints can be ordered up on acceptance of the paper. Manuscripts and all correspondence should be sent to the Editor: Prof. Dr. Carlos R. Soccol **Brazilian Archives of Biology and Technology** Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775-CIC 81350-010 Curitiba-PR, Brazil Fax +55-41-247 67 88 Email:niet@tecpar.br.