



EMPREGO DA CRISTALIZAÇÃO PARA PURIFICAÇÃO DE CICLODEXTRINAS PRODUZIDAS POR CGTase DE BACILO ALCALOFÍLICO IMOBILIZADO EM ESPONJA VEGETAL

Maria Fernanda Alves Aguiar (PIBIC/CNPq/Uem), Cristiane Moriwaki (Coorientadora), Graciette Matioli (Orientadora), e-mail: gmatioli@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/
Departamento de Farmácia / Maringá, PR.

Microbiologia – Microbiologia aplicada

Palavras-chave: Ciclodextrina, Cristalização, Biotecnologia.

Resumo:

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, produzidos a partir da reação de ciclização do amido e catalisada pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). As CDs mais comuns são α -, β - e γ -CD, que apresentam habilidade em encapsular uma larga faixa de moléculas, podendo aumentar sua estabilidade e/ou solubilidade. Este projeto teve por objetivo empregar maltodextrina como substrato e células de *Bacillus firmus* cepa 37 imobilizadas em esponja vegetal para produzir CDs, e empregar o processo de cristalização para purificar a β -CD produzida. As células imobilizadas em esponja vegetal mostraram-se capazes de produzir CDs, e a cristalização para a purificação da β -CD produzida demonstrou ser um método eficiente, pois alcançou uma pureza de 89,54%.

Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, não redutores, nos quais as unidades de glucose estão unidas por ligações α -1,4, sendo constituídas por 6, 7 ou 8 unidades, denominadas de α -, β - ou γ -CD, respectivamente. Elas são produzidas pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). As CDs têm inúmeras aplicações em diferentes áreas, tais como farmácia, alimentos, cosméticos, indústrias têxteis, agricultura, biotecnologia, entre outras. Desta forma, recursos que possam melhorar a sua produção, como a imobilização das bactérias produtoras de CGTases são interessantes. Sistemas de células viáveis imobilizadas são vantajosos, pois permitem o uso contínuo e repetido do micro-organismo. Devido à baixa solubilidade da β -CD, quando comparada



com as outras CDs, a cristalização é a técnica mais apropriada para a purificação desta molécula. Considerando a importância das CDs e suas inúmeras aplicações industriais, a presente pesquisa teve por objetivo imobilizar *Bacillus firmus* cepa 37 em esponja vegetal para ser usado como fonte direta de produção de CDs e utilizar o processo de cristalização para purificar a β -CD produzida.

Materiais e métodos

Condições de cultivo e reativação do micro-organismo

B. firmus cepa 37 foram cultivados em meio sólido contendo amido solúvel, polipeptona, extrato de levedura, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2CO_3 e ágar, e em seguida liofilizados. Para a reativação, 30 mg de células foram adicionadas em meio líquido, incubadas a 37°C, 120 rpm por 24 h.

Procedimentos de imobilização

A imobilização de micro-organismos por adsorção em esponja vegetal foi realizada de acordo com Pazzetto e colaboradores (2011). Em cada frasco contendo os micro-organismos reativados, foram adicionados três discos de esponja, e esses foram incubados a 37°C, 120 rpm por 10 dias.

Produção de ciclodextrinas e purificação de β -CD por cristalização

As matrizes foram lavadas em salina estéril e então transferidas para os meios de produção contendo maltodextrina, tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, solução de $CaCl_2$ 5mM e água purificada. Estes frascos foram incubados a 60°C, 120 rpm durante 3 dias.

Ao final do ciclo de produção, as esponjas foram removidas e a cristalização de β -CD foi iniciada. As amostras foram centrifugadas (9000 xg, 30°C, 20 min) e o sobrenadante foi incubado a 100°C durante 10 min. Em seguida, as amostras foram descoloridas por carvão ativado 1% (p/V) por 2 h, a 40°C e agitação de 120 rpm. Posteriormente, elas foram filtradas em papel de filtro, novamente centrifugadas (3000 xg, temperatura ambiente, 10 min) e concentradas para 1/3 do volume inicial usando um rota-evaporador a 70°C. Após a etapa de evaporação, o material foi submetido a um resfriamento progressivo em um reator encamisado com agitação magnética. A solução foi resfriada para uma temperatura de 20°C a uma velocidade de 10°C por hora, e esta temperatura foi mantida durante 12 h. Em seguida, o material foi transferido para tubos de centrifuga, resfriados a 10°C e mantido nestas condições por 24 h sem agitação. Os tubos foram centrifugados (9000 xg, 10°C, 20 min) para separar a β -CD precipitada. Esta foi seca em estufa a



60°C durante 24 h, e depois a 80°C durante mais 24 h. Então, o material foi moído até se tornar um pó fino, pesado, e determinada a pureza por CLAE.

Análise de ciclodextrinas

A concentração de β -CD foi determinada por colorimetria utilizando fenoltaleína. α -, β - e γ -CDs foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (TARDIOLI et al, 2006 e MORIWAKI et al., 2007).

Resultados e Discussão

Ao final do ciclo de produção, por meio do método colorimétrico, foi verificado uma concentração de 10,86 mg/mL de β -CD. Por meio do método cromatográfico foi verificado uma produção média de 1,7 mg/mL de α -CD, 11,5 mg/mL de β -CD e 2,5 mg/mL de γ -CD. Após estas análises, os discos foram retirados do meio de produção e o volume resultou em 371 mL. O material foi centrifugado e o sobrenadante foi inativado a CGTase. Por colorimetria foi dosado a concentração de β -CD do precipitado, que resultou em 0,07 mg/mL, e do sobrenadante em 10,78 mg/mL. Por CLAE resultou em 2,1 mg/mL de α -CD, 9,0 mg/mL de β -CD e 3,1 mg/mL de γ -CD (Figura 1).

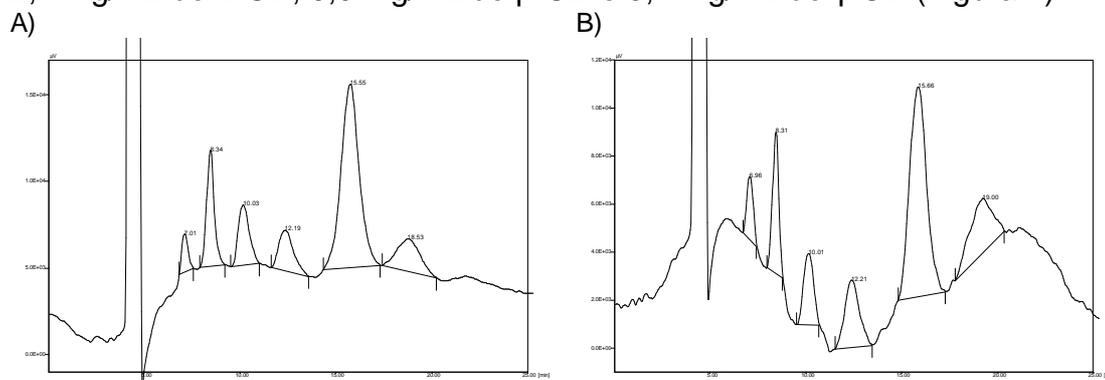


Figura 1 – A) Cromatograma do meio de produção. B) Cromatograma do meio de produção depois de centrifugado e fervido.

Tabela 1 – Resumo dos resultados da produção de CDs por células imobilizadas de *Bacillus firmus* cepa 37 em esponja vegetal e utilizando maltodextrina 5% como substrato.

MALTODEXTRINA 5% Volume total: 371 mL	Amostra A no término da produção (mg/mL) - PHE	Amostra A no término da produção (mg/mL) - HPLC	Amostra A depois de centrifugada e fervida (mg/mL) - PHE	Amostra A depois de centrifugada e fervida (mg/mL) - HPLC	Precipitado A - PHE
Alfa-CD		1,7		2,1	
Beta-CD	10,86	11,5	10,78	9,0	0,07
Gama-CD		2,5		3,1	



Depois de finalizada a cristalização, após a secagem, o material foi pesado e resultou em 2,1417 g. A umidade foi medida pelo método de Karl Fischer que resultou em 10,7692%. Por CLAE foi medido a pureza da β -CD cristalizada que resultou em 89,54% (Figura 2).

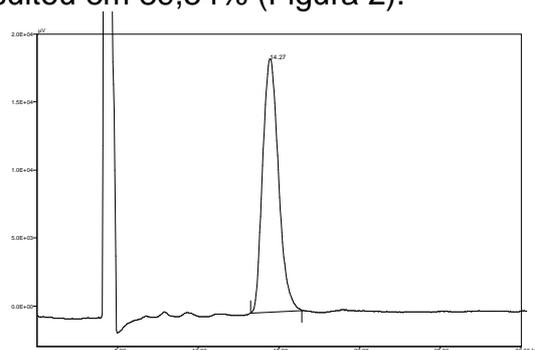


Figura 2 – Cromatograma da amostra cristalizada

Conclusões

As células de *B. firmus* cepa 37 imobilizadas em esponja vegetal, utilizando maltodextrina 5% como substrato, mostraram-se capazes de produzir ciclodextrinas. A cristalização para a purificação da β -CD produzida demonstrou ser um método eficiente, pois alcançou uma pureza de 89,54%.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária.

Referências

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

PAZZETTO, R.; DELANI, T.C.O.; FENELON, V.C.; MATIOLI, G. Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 cells immobilized on loofa sponge. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 46-51, 2011.

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