

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JÉSSIE DA NATIVIDADE SCHÖFFER

**IMOBILIZAÇÃO DIRIGIDA DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE E
PRODUÇÃO MODULADA DE CICLODEXTRINAS POR CULTIVO EM
BATELADA E REATOR CONTÍNUO DE LEITO FIXO**

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMOBILIZAÇÃO DIRIGIDA DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE E
PRODUÇÃO MODULADA DE CICLODEXTRINAS POR CULTIVO EM
BATELADA E REATOR CONTÍNUO DE LEITO FIXO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos como
requisito para a obtenção do grau de
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Jéssie da Natividade Schöffer

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Msc.

Orientador: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Tania Maria Haas Costa

Porto Alegre (RS), Brasil

Junho de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Schöffler, Jéssie da Natividade

Imobilização dirigida de ciclodextrina glicosiltransferase e produção modulada de ciclodextrinas por cultivo em batelada e reator contínuo de leito fixo / Jéssie da Natividade Schöffler. -- 2017.

124 f.

Orientador: Plinho Francisco Hertz.

Coorientadora: Tania Maria Haas Costa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. ciclodextrinas. 2. ciclodextrina glicosiltransferase. 3. imobilização de enzimas. 4. reator de leito fixo. I. Hertz, Plinho Francisco, orient. II. Costa, Tania Maria Haas, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese “Imobilização dirigida de ciclodextrina glicosiltransferase e produção modulada de ciclodextrinas por cultivo em batelada e reator contínuo de leito fixo”, elaborada por Jéssie da Natividade Schöffner, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza (UNIVATES)

Prof.^a Dra. Giandra Volpato (IFRS)

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Para haver dias de glória, haverá muitos dias de luta. Assim, nada mais justo do que, neste momento, agradecer àqueles que, de alguma forma, tornaram possível e estiveram presentes em toda essa caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade e suporte para o desenvolvimento desse trabalho. À CAPES e à FAPERGS pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Plinho F. Hertz pelas oportunidades, ensinamentos e conselhos oferecidos com o carinho de um amigo ao longo destes seis anos de mestrado e doutorado.

À professora Tania Haas Costa pela coorientação, atenção e disposição em ajudar no que fosse preciso. Bem como aos professores Edilson Benvenuti e Eliana de Menezes pela parceria para a realização desta pesquisa.

Ao professor Rafael C. Rodrigues pela disponibilidade, discussões e contribuições acerca do trabalho.

Ao professor Marco Antônio Záchia Ayub meus sinceros agradecimentos pela disponibilização dos laboratórios e equipamentos, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao professor Itabajara e ao pessoal de seu laboratório pela acolhida, em especial ao Lucas e a Lucía pela disponibilidade e ensinamentos transmitidos.

Aos professores, Cláucia Fernanda Volken de Souza, Giandra Volpato e Marco Antônio Záchia Ayub por aceitarem discutir este trabalho, pelas sugestões e colaboração para melhorá-lo.

A todos os colegas do Laboratório de Enzimologia pela amizade e companhia. Em especial, à Carla Matte que me apresentou o mundo da pesquisa e me deixou como legado não só a CGTase, mas o exemplo de dedicação e coleguismo, e a Lovaine Duarte que me

proporcionou passar adiante parte de todo conhecimento adquirido, obrigada por estarem sempre presente e pela amizade.

Aos colegas do Lab 206 pelos momentos de descontração (leia-se: apoio emocional), conversas, conselhos e amizades, essenciais para a conclusão deste trabalho. Agradeço em especial ao Matheus Quintana Barreto pela disponibilidade, paciência e ensinamentos transmitidos!!

Aos meus amados pais, saibam que isso tudo é fruto da dedicação de vocês! Obrigada a vocês e aos meus irmãos, Thiago, Carinne e Christian, pelo amor, carinho e sobretudo pela torcida para que tudo desse certo. Em especial, à minha mãe, agradeço por plantar a semente e encorajar sempre a ir além. Por suas orações que foram suporte em diversos momentos, pela presença (mesmo à distância!), incentivo e exemplo de vida e determinação. Amo vocês, sempre!

Às famílias Natividade, Schöffner, Bender e Kolankiewicz, obrigada por compreenderem nossa ausência, pela acolhida, carinho, preocupação e apoio de sempre.

Vinícius, a você, meu amor, com quem tenho compartilhado meus sonhos e desafios, quero poder agradecer e dividir os frutos deste trabalho por todos os dias de minha vida. Obrigada pelo companheirismo, paciência, amor e carinho, sem os quais eu certamente não chegaria até aqui. Te Amo!

A Deus, pela saúde e bênçãos.

“É saber se sentir infinito, num universo tão vasto e bonito. É saber sonhar!

E, então, fazer valer a pena cada verso daquele poema sobre acreditar.

*Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu,
é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações,
e assim ter amigos contigo em todas as situações...”*

Ana Vilela

RESUMO

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é a única enzima capaz de catalisar a reação de ciclização a partir do amido e, assim, formar oligossacarídeos cíclicos conhecidos como ciclodextrinas (CDs). Através desta reação é produzida uma mistura de α -, β - e γ -CD que, respectivamente, contém 6, 7 e 8 resíduos de glicose. As CDs têm atraído enorme atenção devido ao seu grande potencial de aplicação em diversas áreas da indústria. Potencial este proporcionado por sua estrutura cônica, com interior hidrofóbico, capaz de encapsular sólidos, líquidos e gases, conferindo propriedades importantes e protegendo-os. Neste trabalho foi estudada a imobilização de uma CGTase em sílica mesoporosa de forma direcionada às cisteínas presentes em sua superfície, alterando a exposição do sítio ativo. A ligação via cisteínas nativas da proteína aumentou em quatro vezes a eficiência da imobilização, quando comparada a ligação via grupamento amino. Esta, no entanto, apresentou maior atividade enzimática em faixas mais amplas de temperatura e pH, além de maior estabilidade operacional, mantendo 100 % de sua atividade após 200 h de reação contínua a 60 °C e pH 4. Ainda que apresentando menor estabilidade da ligação, o derivado obtido por ligação dissulfeto manteve 40 % da atividade inicial durante 200 h e então, o suporte pôde ser recarregado e reutilizado por igual período. Os suportes desenvolvidos apresentaram estabilidade satisfatória, possibilitando o uso do derivado imobilizado em reator de leito fixo operado de forma contínua. Quando avaliado em relação a produção das três ciclodextrinas principais, o derivado cuja imobilização da enzima ocorreu via grupamento amino, evidenciou a possibilidade de modulação da produção apenas variando as condições de reação. α - e β -CD foram produzidas preferencialmente em pH 8,0 e 2 min (3,44 mg mL⁻¹ e 3,51 mg mL⁻¹, respectivamente), enquanto que pH mais ácido (4,0) e maior tempo de reação (141 min) favoreceram a formação de γ -CD (3,35 mg mL⁻¹), com baixa formação α -CD (0,75 mg mL⁻¹). Por fim, os resultados deste estudo evidenciam a importância da imobilização da CGTase para a estabilização de sua estrutura a fim de aplicá-la em sistemas contínuos de produção de CDs onde é possível modular o perfil dos produtos gerados em função das condições de reação, aumentando assim a produtividade do biocatalisador.

Palavras chave: ciclodextrinas, ciclodextrina glicosiltransferase, imobilização direcionada, reator de leito fixo.

ABSTRACT

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) is the only enzyme capable of catalyzing the cyclization reaction from the starch and thus forming cyclic oligosaccharides known as cyclodextrins (CDs). Through this reaction, is produced a mixture of α -, β - and γ -CD containing, 6, 7 and 8 glucose residues respectively. Cyclodextrins (CD) have been attracting considerable attention because of its great potential for application in various areas of industry. This potential is provided by its conical structure with hydrophobic interior, capable of encapsulating solids, liquids and gases, changing important features and protecting them. In this work, the immobilization of CGTase in mesoporous silica was studied in a way directed to cysteines present on its surface, altering the exposure of the active site. The connection via native cysteine of the protein increased by four times the efficiency of immobilization compared to amino groups connection. The binding of amino groups, however, showed greater enzymatic activity in wider ranges of temperature and pH, and higher operational stability, while maintaining 100 % of its activity after 200 h of continuous reaction at 60 °C and pH 4. Although showing less stable connection, the derivative obtained by disulfide bond retained 40 % of the initial activity for 200 h and then, the support could be reloaded and reused for the same period. Developed supports showed satisfactory stability, enabling the use of the derivative assets in a packed bed reactor and operated continuously. It was demonstrated the possibility of modulating the CDs production just varying the reaction conditions, using the derivative of which the enzyme immobilization occurred via amino group, to evaluate the production of three main cyclodextrins. α - and β -CD were produced preferentially at pH 8.0 and 2 min (3.44 mg mL⁻¹ and 3.51 mg mL⁻¹, respectively), whereas the more acid pH (4.0) and longer reaction (141 min) favored the formation of γ -CD (3.35 mg mL⁻¹ and 0.75 mg mL⁻¹ of α -CD). Finally, the results of this study show the importance of the immobilization of CGTase to the stabilization of its structure in order to apply it in continuous CD production systems, where it is possible to modulate the profile of the products generated as a function of the reaction conditions, thus increasing the productivity of the biocatalyst.

Keywords: cyclodextrins, cyclodextrin glycosyltransferase, directed immobilization, packed bed reactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura 3D da CGTase com seus cinco domínios (A, B, C, D e E).....	19
Figura 2.2. Estrutura 3D da CGTase mostrando a estrutura TIM-Barrel (vermelho e azul) e, em destaque, a tríade catalítica (amarelo).	20
Figura 2.3. Representação esquemática das reações catalisadas pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase. (A) ciclização e acoplamento, (B) desproporcionalização, (C) hidrólise. Os círculos sombreados representam resíduos de glicose, e os círculos brancos indicam seus terminais redutores.....	21
Figura 2.4. Ação dos aminoácidos do sítio ativo sobre a ligação glicosídica.	22
Figura 2.5. Representação esquemática da formação das ciclodextrinas.	23
Figura 2.6. Estrutura química da α -, β - e γ -CDs.....	25
Figura 2.7. Superior: resíduo de glicose e esquema estrutural da α -CD (n=6), β -CD (n=7) e γ -CD (n=8). Inferior: dimensões geométricas das ciclodextrinas.	26
Figura 2.8. Fluxograma da produção enzimática de ciclodextrinas (a) com a utilização de solventes e (b) sem utilização de solventes..	33
Figura 2.9. Representação dos principais métodos de imobilização: (A) adsorção, (B) aprisionamento, (C) encapsulamento, (D) ligação covalente e (E) reticulação.....	38
Figura 2.10. Grupos funcionais possíveis de serem adicionados à superfície da sílica.	43
Figura 2.11. Diferentes configurações de reatores para enzimas imobilizadas. Sistemas descontínuos: (a) batelada, (b) batelada com recirculação. Sistemas contínuos: (c) tanque agitado contínuo, (d) contínuo de leito fixo, (e) contínuo de leito fluidizado.	47
Figure 3.1. Structure of CGTase showing the active site Asp255, Glu283, Asp354 (blue sticks), the amino terminal (red sticks) and the cysteine (yellow sticks).....	59
Figure 3.2. Textural analysis of materials, (a) Si-NH and derivatives (b) Si-SH and derivatives; (●) Si, (▲) Si-NH, (■) Si-NH-G, (★) Si-NH-G-CGTase; (○) Si, (△) Si-SH, (☆) Si-SH-CGTase.	61
Figure 3.3. Thermogravimetric analysis (TGA) of materials. (a) Si (solid line), Si-NH (dashed line), Si-NH-G (dash-dot line), Si-NH-G-CGTase (dotted line); (b) Si (solid line), Si-SH (dashed line), Si-SH-CGTase (dotted line).....	62

Figure 3.4. SEM images obtained with 100 000 × of magnification of materials. (a) Si, (b) Si-NH, (c) Si-NH-G and (d) Si-NH-G-CGTase, (e) Si-SH and (f) Si-SH-CGTase.....	63
Figure 3.5. Effect of (a) pH (at 60 °C) and (b) temperature (at pH 6.0) on the activity of (●) free and immobilized CGTase on (■) Si-SH and (▲) Si-NH.	64
Figure 3.6. Operational stability of immobilized enzymes operated continuously on packed-bed reactors at 60 °C and pH 6.0 by (●) Si-NH derivative, (■) Si-SH derivative and (□) Si-SH derivative after enzyme reload.....	65
Figure 4.1. Thermogravimetric analyses of silica and its derivatives with different amounts of amino groups. (solid black line) Si, (dashed line) Si-NH-0.29, (dotted line) Si-NH-0.45, (dash-dot line) Si-NH-0.65.	83
Figure 4.2. Cyclodextrins production by (a) free CGTase, 50 °C; (b) free CGTase, 70 °C; (c) immobilized CGTase, 50 °C; (d) immobilized CGTase, 70 °C. (■) α-CD, (■) β-CD, (■) γ-CD.....	85
Figure 4.3. Contour plots of CCD results. Columns: α-, β- and γ-CD at different pH and time and at 50 °C, 70 °C and 90 °C (lines).....	89
Figure 4.4. Continuous production of (●) α-CD, (■) β-CD, (▲) γ-CD at 70 °C, pH 8.0 (a) and pH 4.0 (b), on a packed-bed reactor with immobilized CGTase.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Principais propriedades das ciclodextrinas.....	25
Tabela 2.2. Produtos alimentícios contendo CDs ou fabricados com a utilização de CDs.	28
Tabela 2.3. Parâmetros críticos para o desenvolvimento de um protocolo de imobilização...	37
Tabela 2.4. Vantagens e desvantagens de diferentes métodos de imobilização.....	39
Tabela 2.5. Grupos funcionais reativos dos principais aminoácidos utilizados para imobilização.....	39
Table 3.1. Textural analyses of materials.	62
Table 3.2. Weight loss of materials and an estimate of the concentration of each organic component.	63
Table 4.1. Experimental designs and results of the CCD.	82
Table 4.2. Textural and thermal analyses data.....	84
Table 4.3. CGTase immobilization parameters on Si-NH-G.....	85
Table 4.4. Statistical analysis of the CCD for CDs production.	88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Ciclodextrina glicosiltransferase	19
2.2	Ciclodextrinas	24
2.2.1	Aplicação das ciclodextrinas na indústria de alimentos	27
2.2.1.1	<i>Metabolismo e regulamentação das ciclodextrinas</i>	<i>31</i>
2.2.2	Produção industrial de ciclodextrinas	32
2.3	Imobilização de enzimas.....	35
2.3.1	Métodos para imobilização de enzimas	38
2.3.2	Sílicas como suportes para imobilização de enzimas	41
2.3.3	Imobilização de ciclodextrina glicosiltransferases	44
2.4	Reatores enzimáticos	46
	ARTIGOS CIENTÍFICOS	49
3	Artigo 1 - Directed immobilization of CGTase: the effect of the enzyme orientation on the enzyme activity and its use in packed-bed reactor for continuous production of cyclodextrins.....	50
3.1	Introduction	52
3.2	Materials and methods	54
3.2.1	Materials	54
3.2.2	Synthesis of mesoporous silica.....	55
3.2.3	Organofunctionalization of silica	55
3.2.4	Enzyme immobilization.....	55
3.2.5	Enzymatic activity	56
3.2.6	Optimal pH and temperature	57
3.2.7	Operational stability.....	57
3.2.8	Structural, morphological and textural characterization.....	57

3.3	Results and discussion	58
3.3.1	Enzyme immobilization.....	58
3.3.2	Characterization of supports and derivatives.....	60
3.3.3	Optimal pH and temperature	64
3.3.4	Operational stability.....	64
3.4	Conclusions	67
3.5	References	68
4	Artigo 2 - Effects of immobilization, pH and reaction time in the modulation of α-, β- or γ-cyclodextrins production by cyclodextrin glycosyltransferase: batch and continuous process	75
4.1	Introduction	77
4.2	Experimental section	79
4.2.1	Materials	79
4.2.2	Synthesis and functionalization of mesoporous silica	79
4.2.3	Enzyme immobilization.....	80
4.2.4	Enzymatic activity	80
4.2.5	Cyclodextrins quantification.....	81
4.2.6	Production of cyclodextrins as a function of time	81
4.2.7	Central composite design.....	81
4.2.8	Continuous production of CD in packed-bed reactor	82
4.3	Results and discussion	83
4.3.1	Synthesis and characterization of support	83
4.3.2	CGTase immobilization on mesoporous silica functionalized with aminopropyl	84
4.3.3	α -, β - and γ -CDs production as a function of time.....	85
4.3.4	Evaluation of α -, β - and γ -CDs production using a central composite design (CCD).....	87
4.3.5	Modulated production of α -, β - and γ -CD on continuous reactor.....	90
4.4	Conclusion	93
4.5	References	94
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101

6	PERSPECTIVAS FUTURAS	104
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
	OUTRAS PUBLICAÇÕES.....	121

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são biocatalisadores capazes de atuar em processos específicos e complexos. As vantagens de sua utilização, frente aos catalisadores químicos, surgem de características próprias como alta seletividade e especificidade. Além disso, na maioria das vezes, são capazes de atuar sob condições brandas de temperatura e pressão, reduzindo assim custos de produção.

Contudo, para serem amplamente utilizados pela indústria, é conveniente que tais biocatalisadores possuam algumas características como, por exemplo: serem estáveis em condições diferentes daquelas encontradas em seus ambientes naturais, apresentarem boa atividade e seletividade para com substratos diferentes e, principalmente, serem heterogêneos. Assim, a maioria deles não corresponde aos requisitos para um catalisador industrial e exige adaptação de uma ou mais características antes de sua utilização.

Tais adaptações podem ser alcançadas com o emprego de diferentes técnicas, entre elas, a imobilização de enzimas, considerada uma ferramenta bastante útil para superar suas limitações de uso, uma vez que, quando adequadamente projetada, pode melhorar a estabilidade e, até mesmo, a atividade e seletividade da enzima. Além disso, a facilidade para sua recuperação do meio de reação elimina etapa de desativação posterior e evita que sejam carregadas ao produto final. Por conseguinte, a imobilização de enzimas está se tornando uma excelente alternativa para viabilizar sua utilização em escala industrial, junto a isto, cresce a necessidade de se desenvolver novas estratégias e protocolos apropriados a fim de garantir um derivado enzimático com as propriedades desejadas.

A enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) tem atraído grande interesse da indústria, visto que o principal produto de sua reação, as ciclodextrinas (CDs), possui grande potencial de aplicação nas mais diversas áreas, tais como da química analítica, agricultura, biotecnologia, farmácia e alimentos. O interesse surge devido á capacidade que elas possuem de formar complexos de inclusão e alterar características como, por exemplo, solubilidade, volatilidade e estabilidade de uma variedade de compostos, sólidos, líquidos e gasosos. Na indústria de alimentos, ganham destaque por atuarem como estabilizantes naturais, uma vez que protegem ingredientes sensíveis, melhoram o sabor, influenciam positivamente na

textura e na consistência e, além disso, podem ajudar no enriquecimento de alimentos e bebidas com componentes que promovam a saúde.

Diante da perspectiva de aumento na utilização das CDs na área de alimentos, surge a necessidade de adaptação de seus processos de produção às necessidades da área onde serão aplicadas. Torna-se necessário, portanto, a adequação da enzima CGTase para processos industriais de produção. Com este intuito, diversas pesquisas têm focado em sua imobilização, no entanto, o sucesso tem sido apenas relativo, uma vez que, na grande maioria dos casos, a recuperação da atividade enzimática após sua imobilização ainda é baixa.

Neste contexto, o presente trabalho teve por **objetivo geral** desenvolver uma estratégia para imobilização da enzima ciclodextrina glicosiltransferase, que proporcione estabilidade adequada a fim de possibilitar sua aplicação na produção industrial de ciclodextrinas. Como **objetivos específicos**, são pontuados:

- ✓ Desenvolver suporte adequado para imobilização direcionada da enzima e para utilização em processos contínuos de produção;
- ✓ Direcionar a imobilização, a fim de evitar problemas de impedimento estérico, proporcionando um biocatalisador heterogêneo com boa recuperação da atividade enzimática inicial;
- ✓ Caracterizar os suportes, bem como os derivados desenvolvidos, quanto a sua porosidade, morfologia da partícula e composição química;
- ✓ Analisar os efeitos da imobilização sob parâmetros enzimáticos essenciais como pH e temperatura de atividade;
- ✓ Caracterizar o derivado imobilizado quanto à eficiência de reação e estabilidade;
- ✓ Avaliar a possibilidade de utilização do derivado em sistema contínuo para produção de CDs;
- ✓ Avaliar o efeito da exposição diferenciada do sítio-ativo para a recuperação da atividade após a imobilização da enzima.

Esta tese foi desenvolvida a partir de estudos e experimentos realizados no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este documento está estruturado de modo a abranger, primeiramente, o embasamento teórico pertinente ao desenvolvimento do trabalho. Em seguida, os resultados obtidos são apresentados na forma de artigos científicos contendo os materiais e

métodos utilizados, bem como a discussão dos resultados. E, por fim, são apresentadas as considerações finais e as principais conclusões.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ciclodextrina glicosiltransferase

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19, α -1,4-D-glicano-4- α -D-(1,4- α -D-glicano)-transferase), também conhecida como ciclomaltodextrina glicosiltransferase, é uma enzima membro da família GH13 das glicosidases e do grupo das transferases (CAZy, <http://www.cazy.org/>). Composta por uma cadeia única de polipeptídeos, possui massa molecular da ordem de 75 kDa, com aproximadamente 700 aminoácidos organizados em cinco domínios (**Figura 2.1**) (UITDEHAAG et al., 1999; VAN DER VEEN et al., 2000a).

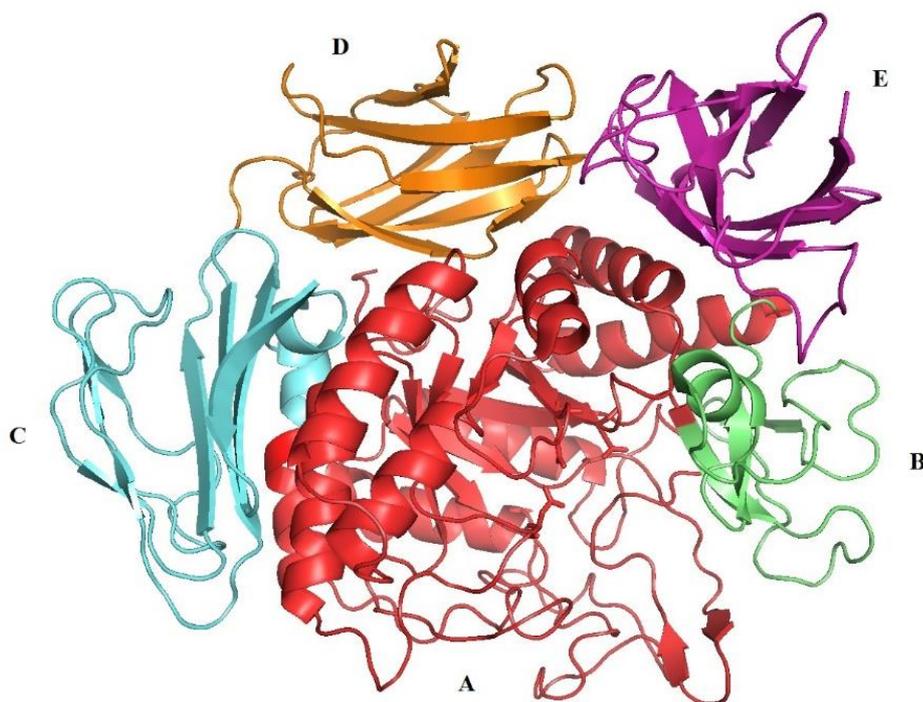


Figura 2.1. Estrutura 3D da CGTase com seus cinco domínios (A, B, C, D e E). Código PDB: 1CGT. Imagem obtida no software PyMOL versão 1.7.4.4 Edu.

O domínio A, característico das α -amilases, apresenta a estrutura clássica TIM-Barrel (α/β)₈, que contém oito α -hélices e oito folhas β paralelas em um padrão simétrico na forma de um barril (**Figura 2.2**). Esta estrutura orienta a tríade catalítica, constituída por três aminoácidos

de alta conservação: Asp229, Glu257 e Asp328, na formação do sítio ativo das CGTases. O domínio B é visto como um laço protuberante do domínio A e contém resíduos de aminoácidos que desempenham papéis centrais na ligação com o substrato. Os domínios C e E também possuem importantes aminoácidos que fazem parte dos múltiplos sítios de ligação da enzima, permitindo a interação com o substrato e guiando os fragmentos lineares pelo espaço em torno do sítio-ativo. Já o domínio D está presente apenas em CGTases e sua função ainda é desconhecida (KLEIN et al., 1991; VAN DER VEEN et al., 2000c; UITDEHAAG et al., 2002; QI et al., 2007; HAN et al., 2014).

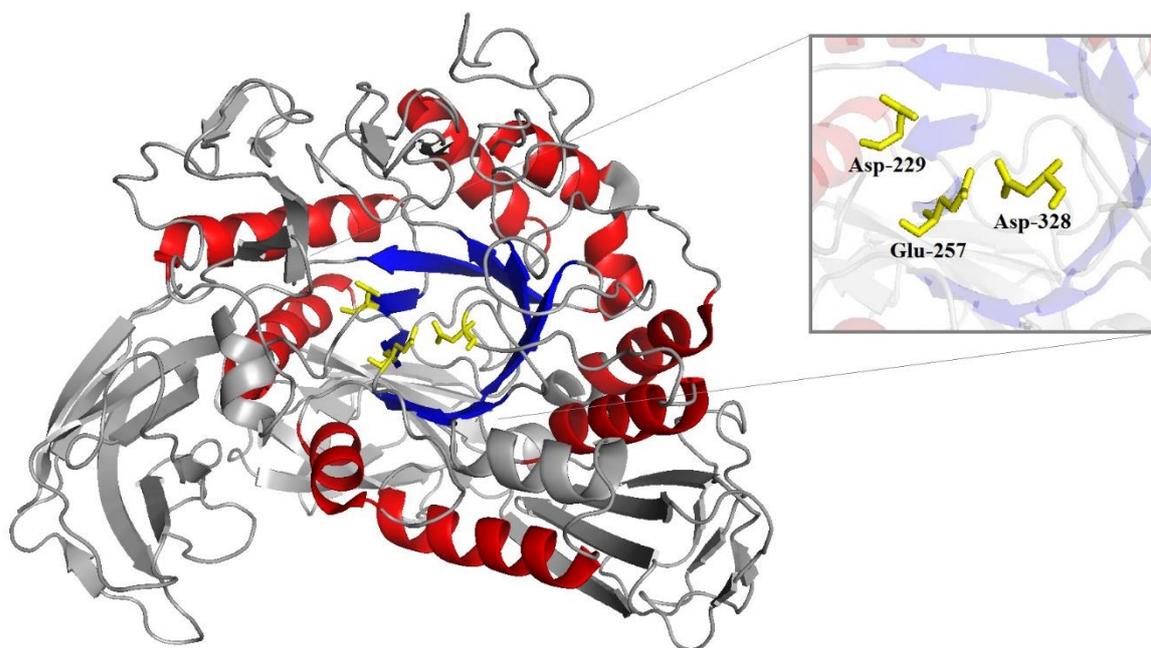


Figura 2.2. Estrutura 3D da CGTase mostrando a estrutura TIM-Barrel (vermelho e azul) e, em destaque, a tríade catalítica (amarelo). Código PDB: 1CGT. Imagem obtida no software PyMOL versão 1.7.4.4 Edu.

Sua estrutura terciária costuma formar até três sítios de ligação com Ca^{2+} , nas interfaces entre os domínios A/B e A/D e no domínio A. A formação de pontes salinas nestes locais promove maior estabilização e confere significativa influência na termoestabilidade apresentada por algumas destas enzimas (GOH et al., 2012a; b; LI et al., 2013; LI et al., 2014a), característica essa de particular interesse, uma vez que os processos em que são utilizadas requerem temperaturas elevadas a fim de reduzir a viscosidade da solução de substrato (KLEIN et al., 1991; LI et al., 2014b; SAOKHAM et al., 2017).

Esta enzima reconhece e age sobre as ligações α -(1,4) presentes no amido e nos oligossacarídeos lineares tais como maltose, maltodextrina e maltotriose. Sobre estes substratos, quatro reações distintas são catalisadas (**Figura 2.3**): três delas de transglicosilação (desproporcionalização, ciclização e acoplamento) e uma de hidrólise (SVENSSON et al., 2009). Estas reações fazem uso de um mecanismo básico, encontrado em toda família das α -amilases, chamado de α -retenção, e diferem apenas na molécula acceptora após o rompimento da ligação.

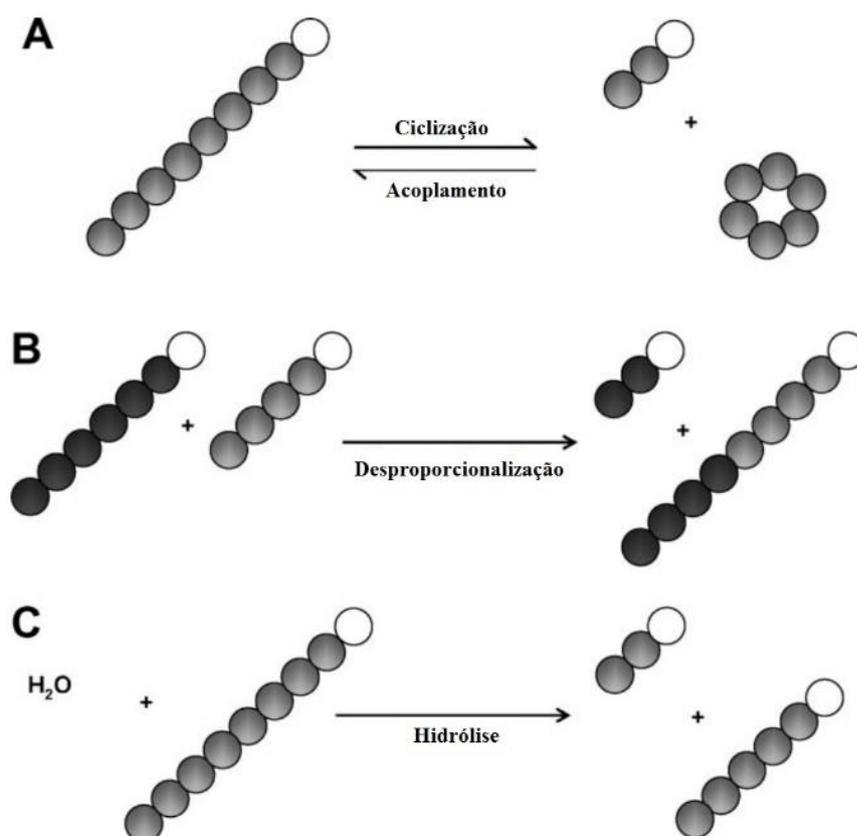


Figura 2.3. Representação esquemática das reações catalisadas pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase. (A) ciclização e acoplamento, (B) desproporcionalização, (C) hidrólise. Os círculos sombreados representam resíduos de glicose, e os círculos brancos indicam seus terminais redutores. Fonte: Svensson et al. (2009).

Segundo van der Veen et al. (2000c), a reação de desproporcionalização é a principal, onde um oligossacarídeo linear é clivado e uma das partes é transferida para outro aceptor, também linear. A ciclização, reação de transglicosilação intramolecular, ocorre quando a extremidade não redutora de um oligossacarídeo linear é ligada em sua própria extremidade redutora, formando produtos cíclicos (chamados de ciclodextrinas). Já no acoplamento, reação inversa da ciclização, ocorre a abertura de um anel de ciclodextrina, seguida pela transferência

para um oligossacarídeo linear. Adicionalmente, a enzima é capaz de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas, quando uma molécula de água participa da reação (VAN DER VEEN et al., 2000c; UITDEHAAG et al., 2002; QI et al., 2007).

As reações catalisadas por esta enzima têm início com a retenção do substrato, que se liga ao resíduo Asp229. Após essa aproximação, a cadeia lateral do Glu257 forma uma ligação por ponte de hidrogênio com o átomo de O-4 da glicose e então o Asp328 interage com os grupos OH-2 e OH-3, estabilizando o estado de transição da reação (**Figura 2.4**). Outros resíduos atuantes na reação são His327 e Arg227 que se ligam com o grupo OH-2 do substrato. Estas ligações de hidrogênio têm duas finalidades, distorcer o anel da glicose para a conformação meia-cadeira e reduzir a eletronegatividade do grupo OH-2, evitando a formação de um estado de transição desfavorável. A partir deste complexo enzima-substrato pode ocorrer qualquer uma das quatro reações descritas anteriormente. Em ambos os casos, a cadeia do oligossacarídeo é clivada entre os subsítios -1 e +1 da enzima, estando o resíduo de glicose do subsítio -1 ligado covalentemente ao Asp229. Subsequentemente, os resíduos ligados aos subsítios +1 e +2 precisam dar espaço a uma molécula receptora ou à sua própria extremidade não redutora, em caso de ciclização (**Figura 2.5**) (UITDEHAAG et al., 1999; VAN DER VEEN et al., 2000a; VAN DER VEEN et al., 2000c; UITDEHAAG et al., 2002; VAN DER MAAREL et al., 2002).

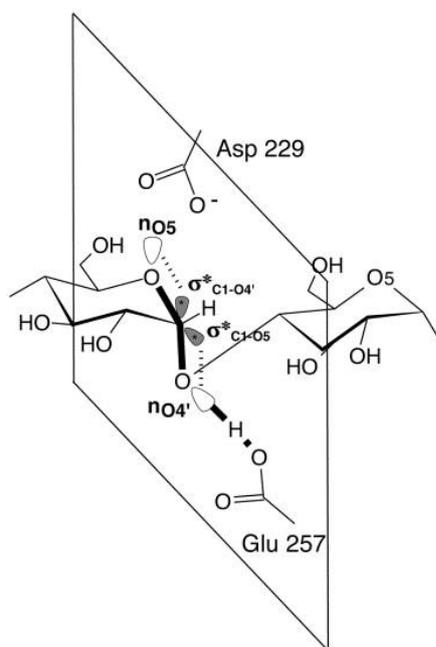


Figura 2.4. Ação dos aminoácidos do sítio ativo sobre a ligação glicosídica. Fonte: Uitdehaag et al. (2002).

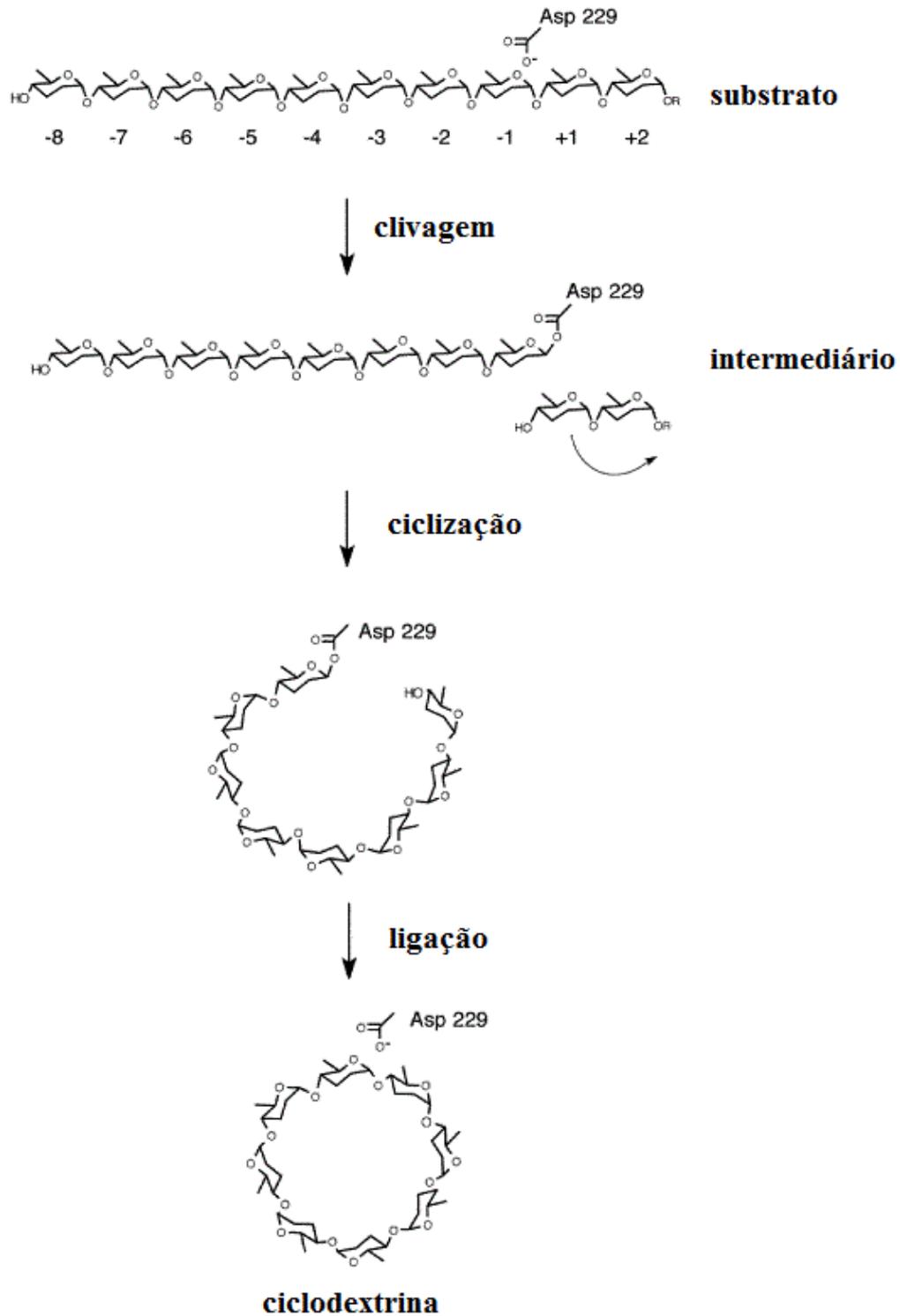


Figura 2.5. Representação esquemática da formação das ciclodextrinas. Adaptado de Uitdehaag et al. (2002).

A reação de ciclização, catalisada pela CGTase sobre o amido, tem sido foco de grande interesse industrial uma vez que esta é a única enzima capaz de produzir oligossacarídeos cíclicos (ciclodextrinas). Através da catálise dessa reação, as CGTases convertem amilose ou

amilopectina em uma mistura de dextrinas lineares e ciclodextrinas de diferentes tamanhos (α -, β - e γ -ciclodextrinas) (TERADA et al., 1997; HAN et al., 2014). Conforme sua especificidade de produto, CGTases são frequentemente classificadas em três subgrupos: α -, β - ou γ -CGTase (VAN DER VEEN et al., 2000c; QI et al., 2005). A razão entre as CDs formadas depende, portanto, da origem da enzima, assim, a seleção de cepas que produzam CGTases com alta seletividade para uma delas facilitaria o processamento industrial e reduziria os custos de purificação. De acordo com Saokham e Loftsson (2017) aproximadamente 70 % da produção global de CDs é de β -CD, enquanto α -CD e γ -CD respondem por aproximadamente 15 e 5 %, respectivamente, o que tem estimulado a pesquisa na busca de alternativas para aumentar a produção de α - e γ -CDs.

Desde a descoberta da CGTase, vários microrganismos foram descritos como produtores da mesma, havendo predomínio do gênero *Bacillus* (ALVES-PRADO et al., 2002). Dentre as bactérias já identificadas como produtoras da enzima incluem-se: aeróbias mesofílicas (como *Bacillus macerans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus obhensis*, *Bacillus agaradhaerens* LS-3C, *Bacillus firmus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paenibacillus pabuli*), aeróbias termofílicas (*Bacillus stearothermophilus*), algumas anaeróbias termofílicas (*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1, *Thermoanaerobacter* sp. ATCC 53627) e anaeróbias termoalcalófilas (*Anaerobranca gotschalkii*) (TONKOVA, 1998; ABD RAHMAN et al., 2004; AVCI et al., 2009).

2.2 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs), também conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses e dextrinas de Schardinger (DEL VALLE, 2004), são oligossacarídeos cíclicos não redutores, formados a partir de resíduos de glicose unidos por ligações α -(1,4) através da ação exclusiva de ciclodextrina glicosiltransferases sobre o amido solúvel. As mais comuns são constituídas por 6 (α -CD, ciclohexamilose), 7 (β -CD, cicloheptamilose) ou 8 (γ -CD, ciclooctamilose) monômeros de glicose (**Figura 2.6**). Embora CDs de maior grau de polimerização possam ser formadas, sua estabilidade é muito fraca. Por outro lado, as tensões formadas no anel torna improvável a existência de anéis com apenas cinco unidades de glicose (TERADA et al., 1997;

SZEJTLI, 1998; VAN DER VEEN et al., 2000b; YAMAMOTO et al., 2000; ELLOUZE et al., 2011). Suas características principais estão apresentadas na **Tabela 2.1**.

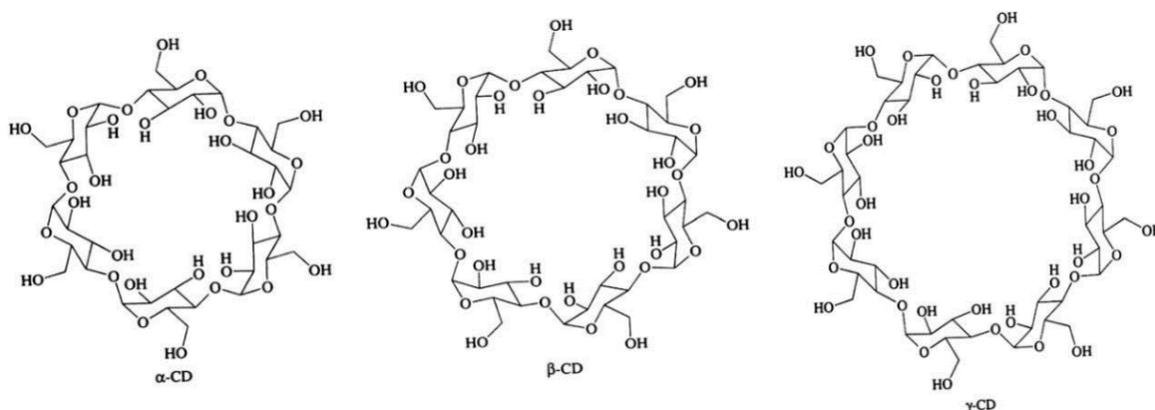


Figura 2.6. Estrutura química da α -, β - e γ -CDs. Fonte: Astray et al. (2009).

Tabela 2.1. Principais propriedades das ciclodextrinas.

Características	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidades de glicose	6	7	8
Massa molecular (g/mol)	972	1.135	1.297
Solubilidade (g/100 mL a 25 °C)	14,5	1,85	23,25
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6	7,5-8,3
Altura do cone (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427

Fonte: Adaptado de Szejtli (1998).

Os resíduos de glicose estão organizados de forma que todas as hidroxilas são orientadas para o exterior das CDs, estando as hidroxilas primárias projetadas para uma das extremidades (a de menor diâmetro), enquanto as secundárias formam a cavidade maior. Desta forma, estas moléculas assumem um formato cilíndrico cônico, cujo diâmetro é determinado pelo número de unidades de glicose (**Figura 2.7**). Tais hidroxilas conferem às CDs um exterior hidrofílico, com capacidade de serem solubilizadas em água. Sua cavidade, porém, possui os esqueletos de carbono das glicoses e é revestida por átomos de hidrogênio apolares e pelos oxigênios das ligações glicosídicas que, por possuírem pares de elétrons livres proporcionam elevada densidade eletrônica e, por consequência, promovem característica hidrofóbica ao seu interior. Além disso, internamente ocorrem interações de hidrogênios entre glicoses adjacentes (entre o C2 de uma unidade e o C3 de outra) o que torna a estrutura ainda mais rígida e altera seu formato de “rosca” (SZEJTLI, 1997; VAN DER VEEN et al., 2000b; YAMAMOTO et al., 2000). A formação destas pontes de hidrogênio intramoleculares é, provavelmente, a explicação

para a menor solubilidade da β -CD em relação as demais, já que estas possuem a configuração mais propícia para que ocorram (COLEMAN et al., 1992). A substituição das hidroxilas externas (em processos de acetilação, metilação e outras derivatizações) resulta em CDs com diferentes propriedades físico-químicas e tem sido explorada, entre outros objetivos, como forma de aumentar a solubilidade da β -CD (SZENTE et al., 1999; DEL VALLE, 2004; ASTRAY et al., 2009; MALANGA et al., 2016).

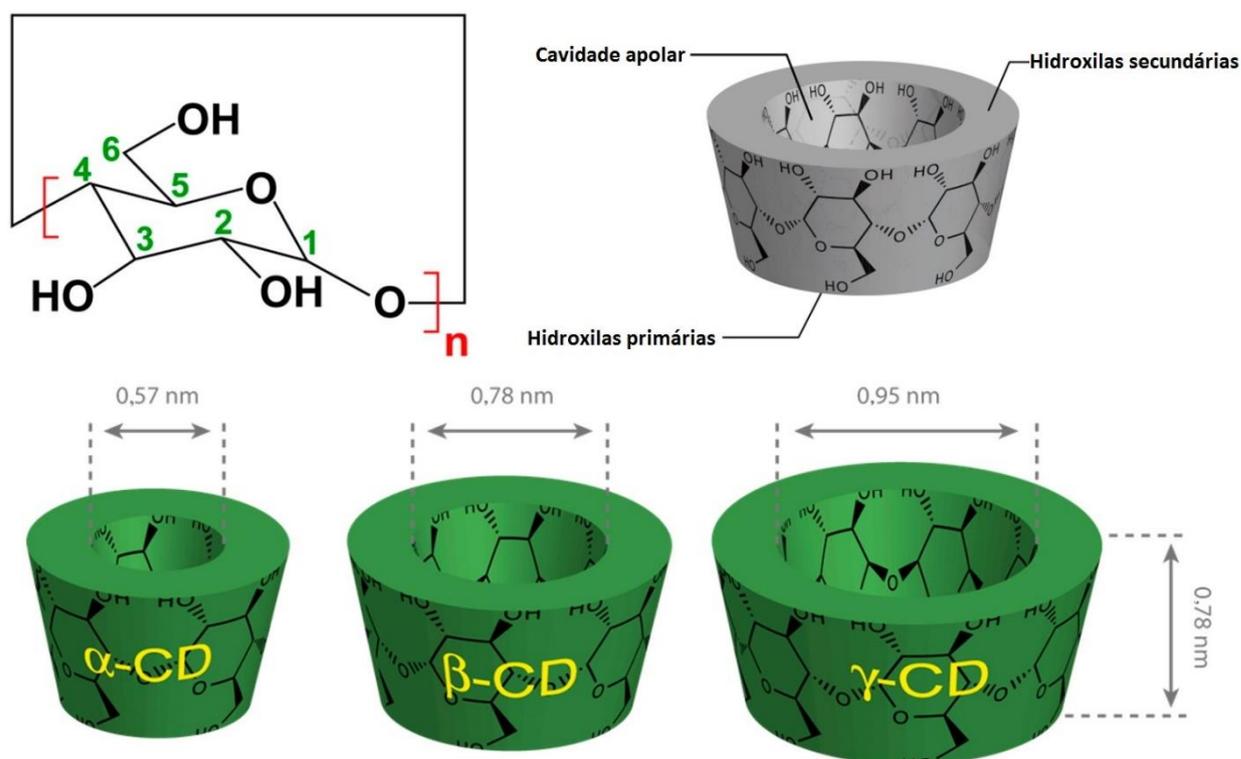


Figura 2.7. Superior: resíduo de glicose e esquema estrutural da α -CD (n=6), β -CD (n=7) e γ -CD (n=8). Inferior: dimensões geométricas das ciclodextrinas. Fonte: adaptado de Crini (2014).

As características estruturais das CDs permitem que sólidos, líquidos ou gases sejam encapsulados em seu interior, formando complexos de inclusão estabilizados por interações hidrofóbicas, de van der Waals e ligações de hidrogênio (SINGH et al., 2002; DEL VALLE, 2004; ASTRAY et al., 2009; KURKOV et al., 2013). A formação destes complexos ocorre pela substituição da água inclusa por moléculas adequadas e é influenciada pela estrutura, carga, polaridade e, especialmente, pela compatibilidade geométrica entre a cavidade da CD e a molécula a ser encapsulada (DEL VALLE, 2004; ASTRAY et al., 2009; ASTRAY et al., 2010). Assim, tendo em vista as diferenças apresentadas na **Tabela 2.1**, é esperado que cada uma das CDs seja apropriada para a encapsulação de compostos específicos, que possam ser

adequadamente acomodados na cavidade hospedeira (ASTRAY et al., 2010; FENYVESI et al., 2016; LIMA et al., 2016).

Usualmente, os complexos formados correspondem ao tipo 1:1 (CD:hóspede), no entanto, as ciclodextrinas são capazes de encapsular não somente compostos de baixo peso molecular mas também moléculas maiores e até mesmo polímeros. Quando a molécula a ser encapsulada for maior do que a cavidade da CD, podem ser formados complexos dos tipos 2:1, 3:1, 3:2 ou maiores, formando verdadeiros colares de ciclodextrinas (HARADA, 1996; 1997; DEL VALLE, 2004; LIMA et al., 2016; REIS et al., 2017).

A encapsulação altera o comportamento das moléculas hóspedes, levando a consequências importantes, tais como: aumento da estabilidade (ao calor, e a oxidação, por exemplo) e da solubilidade aparente da molécula encapsulada; diminuição de sua volatilidade e isolamento físico de compostos incompatíveis ou, ainda, diminui ou disfarça o gosto ou cheiro desagradável de compostos ativos. A possibilidade de utilizá-las para alterar características e proteger o encapsulado leva as várias aplicações das CDs e tem atraído o interesse da ciência e da indústria. A versatilidade das CDs é demonstrada diante da variada gama de aplicações em áreas como da química analítica, agricultura, biotecnologia, farmácia, entre outras (SZEJTLI, 1998; VAN DER VEEN et al., 2000a; YAMAMOTO et al., 2000; QI et al., 2005; LOFTSSON et al., 2007; ASTRAY et al., 2010; SUVARNA et al., 2017).

2.2.1 Aplicação das ciclodextrinas na indústria de alimentos

A utilização das CDs em alimentos pode ocorrer tanto de forma direta quanto através de processos tecnológicos de produção, auxiliando na preservação de suas propriedades organolépticas e nutricionais. Assim, as CDs têm sido estudadas desde 1970 para aplicação no setor alimentício com uma variedade de propósitos, entre eles, proteger componentes contra degradação oxidativa e alterações induzidas por luz e calor (GRAY et al., 1970; REINECCIUS et al., 2004); solubilizar e estabilizar corantes, compostos de aroma (REINECCIUS et al., 2004; BARÁNKOVÁ et al., 2016), vitaminas (GONNET et al., 2010) e óleos essenciais (MARQUES, 2010; COSTA et al., 2015); eliminar componentes indesejáveis (KIM et al., 2004; ALONSO et al., 2010); mascarar ou reduzir odores e sabores desagradáveis (SZEJTLI et al., 2005); e para conseguir liberação controlada de compostos bioativos (ASTRAY et al., 2009; MARTINA et

al., 2013), todos eles abordados em uma revisão completa de Fenyvesi et al. (2016) intitulada “*Cyclodextrins in Food Technology and Human Nutrition: Benefits and Limitations in 2012*”.

Exemplos de produtos contendo CDs em sua composição ou que utilizaram CDs durante o processo de produção foram listados por Szente e Szejtli (2004) (**Tabela 2.2**). Entretanto o preço para obtenção de CDs em grau alimentício ainda é visto como um obstáculo para o seu amplo uso na área de alimentos (ĐORĐEVIĆ et al., 2015).

Tabela 2.2. Produtos alimentícios contendo CDs ou fabricados com a utilização de CDs.

Nome comercial	Tipo de produto	Função da CD utilizada
Natural (França)	Queijo com teor reduzido de colesterol	Reduzir teor de colesterol
Cyroma-line (Hungria)	Açúcar aromatizado para panificação	Preservar <i>flavor</i> durante aquecimento
Balade (Bélgica)	Manteiga com baixo teor de colesterol	Reduzir teor de colesterol
Simply Eggs (EUA)	Ovos com baixo teor de colesterol	Reduzir teor de colesterol
FlavorAktiv Standard Kit (Grã Bretanha)	Padrões de sabor de cerveja	Preservar os padrões de <i>flavor</i>
Flavono (Japão)	Goma de mascar	Estabilizar <i>flavor</i>
Choco Bar (Japão)	Chocolate	Emulsificante
Poder Tea (Japão)	Chá verde instantâneo	Estabilizar a cor
Gymet (Japão)	Bebida dietética com fibras	Mascarar sabor
Stick Lemon (Japão)	Chá instantâneo	Preservar <i>flavor</i>

Fonte: adaptado de Szente e Szejtli, (2004).

A proteção conferida pelas CDs foi avaliada em diversos trabalhos que as utilizaram, por exemplo, como antioxidante secundário em sucos, e observaram a redução da ação de polifenoloxidasas devido a encapsulação de seus substratos e assim, obtiveram melhor controle do escurecimento enzimático, sem alterações significativas nas propriedades organolépticas do produto (LÓPEZ-NICOLÁS et al., 2007; ANDREU-SEVILLA et al., 2011). Além disso, a adição de α -CD em suco de pera resultou em um produto com melhores características em função da estabilidade conferida aos componentes responsáveis pelo perfil de aroma (ésteres, aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos) (LÓPEZ-NICOLÁS et al., 2009). Outros trabalhos

obtiveram sucesso na utilização de CDs com a finalidade de minimizar a perda de carotenos durante a clarificação de sucos (KARANGWA et al., 2012) e para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de terpenos (LIMA et al., 2016). β -CD também foi adicionada para proteção de compostos de cor provenientes de pigmentos vermelhos de pimenta durante armazenamento de iogurte, mostrando serem úteis para a aplicação em conjunto com outros aditivos naturais (GOMES et al., 2014). Reineccius et al. (2002) também demonstraram que as CDs são capazes de promover a estabilização de compostos de aroma, tendo a γ -CD apresentado maior retenção durante a secagem por atomização. No entanto, os compostos encapsulados por α - e β -CD obtiveram melhor estabilidade durante o armazenamento. Os autores sugerem então, o uso de sistemas mistos de CDs para melhor desempenho.

Além de conferirem proteção e estabilização de ingredientes naturalmente presentes, a aplicação de CDs também tem sido avaliada para a produção de alimentos com benefícios adicionais como carreadores de compostos lipofílicos como vitamina, antioxidantes, carotenoides flavonoides e ácidos graxos poliinsaturados (DE VOS et al., 2010; MARQUES, 2010). Neste sentido, os complexos de inclusão podem ser úteis para superar as restrições de uso de óleos essenciais em alimentos, por exemplo, reduzindo sua volatilidade e liberando-os progressivamente durante o armazenamento ou em processamentos posteriores (KFOURY et al., 2015). Apesar de suas propriedades nutricionais e atividades antimicrobiana e antioxidante, o óleo de alho também tem sua aplicação limitada devido a volatilidade, forte odor, baixa estabilidade e insolubilidade em água. No entanto, estas limitações puderam ser contornadas pela sua encapsulação em β -CD, que acarretou no aumento da solubilidade e estabilidade, possibilitando sua posterior liberação de forma controlada em função do tempo e da temperatura empregada (WANG et al., 2011).

A encapsulação de fitoesteróis, reconhecidos por seu efeito anticarcinogênico e na prevenção de doenças cardiovasculares, com CDs também foi avaliada para o aumento de seu valor nutracêutico e aplicação em bebidas como leite e sucos (SCHWARZER et al., 2011). A rápida autooxidação dos óleos pode ser prevenida por complexação e, em pesquisa desenvolvida por López-Nicolás (1997) os ácidos linoleico (C18:2, ω 6) e araquidônico (C20:4, ω 6) foram complexados com β -CD e protegidos contra a oxidação enzimática por lipoxigenase. Arora e Damodaran (2011) utilizaram β -CD para remoção de fosfolípídeos residuais em isolado proteico de soja, a fim de evitar a autooxidação e a produção de *off-flavors*. A redução alcançada

foi de 36 % com solução de β -CD 10 mM e de 99 % quando utilizada em conjunto com tratamento de sonicação e fosfolipase.

A eliminação de sabores e odores indesejáveis é capaz de melhorar ainda mais a qualidade dos alimentos e contribuir para o sucesso no mercado. Linde et al. (2009) avaliaram o emprego da α -CD para mascarar sabor de hidrolisados de proteínas e, assim, permitir sua aplicação em bebidas ácidas. A encapsulação alterou a percepção do sabor amargo dos aminoácidos analisados e reduziu o amargor da proteína hidrolisada de soja. Essas alterações ocorrem como consequência da encapsulação, visto que as moléculas complexadas não reagem com as papilas gustativas. Assim, componentes amargos e adstringentes, tais como, naringina em sucos cítricos (KONNO et al., 1982; YANG et al., 2013) também podem ser complexados com CDs tendo a percepção de seu sabor indesejável reduzida ou completamente eliminada.

Outra importante função das CDs, é na redução do teor de colesterol, proporcionada pela ação sequestrante, em especial da β -CD (por ser menos polar que as demais e por possuir as dimensões apropriadas para encapsulação desta molécula), formando complexos insolúveis que podem ser removidos por centrifugação. Assim, Jeong et al. (2014) obtiveram redução de 93 % do colesterol em ovos e avaliaram, com bons resultados, a possibilidade de recuperação e reutilização da β -CD. Em outros trabalhos, utilizaram-na para a remoção de colesterol em leite (alcançando reduções entre 80 e 95 %), manteiga, queijos e outros derivados destes (KIM et al., 2004; BAE et al., 2008; ALONSO et al., 2009; DIAS et al., 2010; JEON et al., 2012; MASKOOKI et al., 2013). CDs também são recomendadas para a remoção de ácidos graxos livres em frituras (CONTE et al., 1996), encapsulação de compostos alergênicos (DECOCK et al., 2006).

A capacidade de retenção e/ou liberação controlada de moléculas foi investigada para o desenvolvimento de embalagens bioativas com atividade antimicrobiana, para retenção de compostos indesejáveis ou para liberar princípios ativos ao alimento já embalado (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2011; AYTAC et al., 2014; KFOURY et al., 2015). Wen et al. (2016) desenvolveram uma película de PVA (álcool polivinílico) com óleo essencial de canela encapsulado em β -CD. O filme, com atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* devido a liberação gradativa do óleo essencial, prolongou a vida útil de morangos. López-de-Dicastillo et al. (2011) obtiveram redução de 23 % do colesterol presente em leite UHT quando exposto a películas formadas pelo copolímero etileno-vinil álcool contendo β -CD e também a redução de aldeídos (substâncias que se desenvolvem como resultado de processos oxidativos)

em amendoins embalados. Já Siro e colaboradores (2006) demonstraram que a complexação em CDs pode ser a chave para um efeito antioxidante duradouro quando moléculas com estas características são adicionadas em polímeros na fabricação de embalagens.

Além de atuarem como coadjuvantes, as CDs podem ser adicionadas a bebidas e alimentos como fibra alimentar solúvel com algumas vantagens em relação as fibras comuns. Enquanto estas são, muitas vezes, pouco estáveis sob condições de calor ou ácido, as CDs não apresentam estes inconvenientes (nenhuma degradação ocorre até 100 °C e até pH 2,4). Além disso, muitas fibras dietéticas contêm açúcares redutores cuja reação com proteínas (reação de Maillard) pode levar a alterações de cor indesejáveis em certos alimentos e bebidas. Como as CDs não apresentam função redutora, não promovem o escurecimento dos alimentos, independentemente do pH (CRAVOTTO et al., 2006).

2.2.1.1 Metabolismo e regulamentação das ciclodextrinas

As CDs possuem muitas das características físico-químicas e biológicas das dextrinas lineares análogas. Entretanto, devido a sua estrutura cíclica, são mais resistentes a hidrólises ácidas e enzimáticas (SAOKHAM et al., 2017). Por apresentar uma estrutura menos rígida, a γ -CD se encaixa no sítio ativo das α -amilase salivares, e então, sua degradação tem início com a abertura do anel e a formação de uma maltooctose linear. Como são necessárias três unidades de glicose “praticamente lineares” para ligar-se ao sítio ativo e a flexibilidade das CDs menores só as permite ter duas, α - e β -CD não podem ser clivadas pelas α -amilases humanas. Assim, enquanto a γ -CD é completamente digerida, α - e β -CDs chegam ao trato gastrointestinal intactas, onde são susceptíveis à digestão por α -amilases de origem bacteriana (MARSHALL et al., 1981; KONDO et al., 1990; SAHA et al., 1992; HARANGI et al., 2012; SAOKHAM et al., 2017). Estudos mostram que, apesar de a γ -CD ser rapidamente degradada para formar maltose e maltotriose, a formação de complexos de inclusão impede ou retarda sua clivagem pelas α -amilases (HARANGI et al., 2012; SAOKHAM et al., 2017).

Uma vez que α - e β -CDs não são digeridas no trato gastrointestinal, sendo fermentada pela microflora intestinal são, por definição, classificadas como fibras dietéticas solúveis e prebióticos (DE BIE et al., 1998; WHO, 2002; 2004; LI et al., 2014b; PRANCKUTE et al., 2014). Embora a γ -CD seja mais prontamente digerida pelas amilases salivares e pancreáticas do que a α - e a β -CD, seu metabolismo não é completo na região superior do trato

gastrointestinal. Estudos apontam que porções de γ -CD podem permanecer intactas e também estarem disponíveis para fermentação no intestino, alterando a população bacteriana com o aumento do número de bifidobactérias e lactobacilos e concomitante diminuição de patógenos como *Clostridium perfringens* (SPEARS et al., 2005). Devido a estas mudanças favoráveis na microflora intestinal a γ -CD também é considerada como prebiótico (FENYVESI et al., 2016).

Com base em diversas pesquisas realizadas, atualmente, a segurança toxicológica das três CDs está comprovada (MARTINA et al., 2013). Todas são reconhecidas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e podem ser comercializadas como tal nos EUA (FDA, 2000; 2001; 2004). Já no Japão, as três CDs são aceitas como produtos naturais advindos de amido modificado enzimaticamente e sua comercialização em alimentos é restringida apenas por questões sobre sua pureza. No Brasil, a ANVISA determina que aditivos e coadjuvantes de tecnologia devem atender aos requisitos de identidade e de pureza e as demais especificações elaboradas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e permite o uso da α - e da β -CD como aditivos, sem exigências específicas, para a elaboração de aromatizantes, como espessante e estabilizante (BRASIL, 2007).

Nos últimos anos, o “Joint Expert Food Committee Additives (JEFCA)”, comitê científico internacional administrado conjuntamente pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) analisou a utilização de α -, β - e γ -CD em alimentos a fim de atribuir uma DDA (Dose Diária Aceitável), quando aplicável. Embora não obrigatório, a recomendação do JECFA para um nível máximo de β -CD nos alimentos é de 5 mg/kg/dia. O comitê julgou desnecessário estipular valores para α - e γ -CD em virtude de seus perfis toxicológicos (EPA, 2005). α -, β - e γ -CDs estão registradas no Codex Alimentarius com o INS n° 457, 459 e 458, respectivamente (JECFA, 2013).

2.2.2 Produção industrial de ciclodextrinas

No início da década de 1980, a produção de CDs aumentou significativamente, impulsionada pelo conhecimento mais preciso em relação a sua toxicidade e melhor compreensão sobre o encapsulamento molecular proporcionado por elas e, assim, pelo surgimento de várias aplicações (em especial na área farmacêutica) (CRINI, 2014). Industrialmente, as CDs são obtidas mediante ação de CGTases por dois diferentes métodos: pela utilização de solventes orgânicos, adicionados para formar um complexo insolúvel com

determinada ciclodextrina, ou pelo processo sem solventes, no qual são aplicadas técnicas posteriores de separação (**Figura 2.8**).

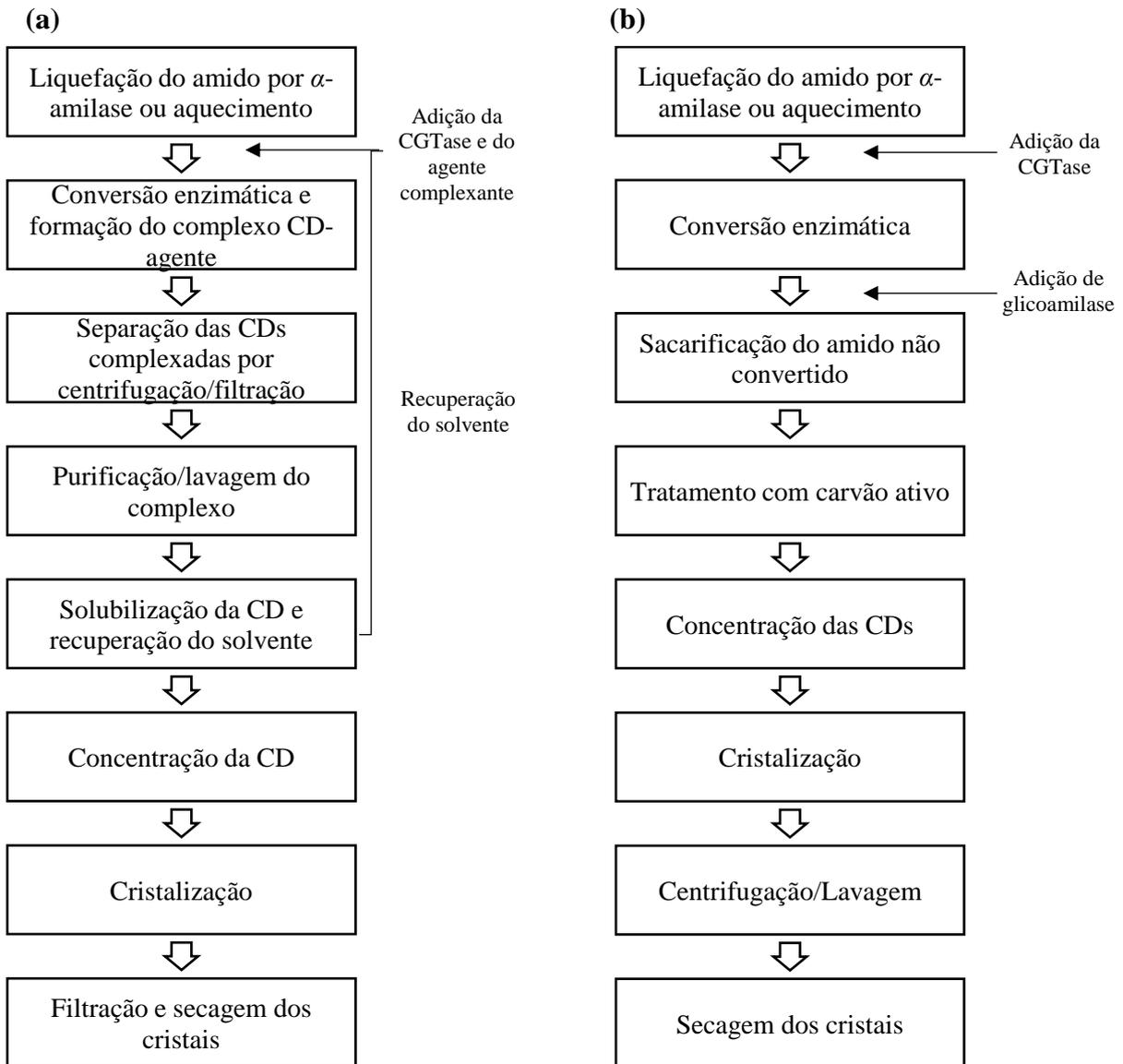


Figura 2.8. Fluxograma da produção enzimática de ciclodextrinas (a) com a utilização de solventes e (b) sem utilização de solventes. Fonte: adaptado de Saokham e Loftsson (2017), Li et al. (2007) e Li et al. (2014b).

O processo tem início com a liquefação do amido (geralmente em concentrações de 20 a 30 %), aumento da temperatura e adição de ácidos (HCl) ou enzimas termotolerantes (α -amilases ou CGTases). A mistura de reação é, posteriormente, resfriada até a temperatura de ação da CGTase, que é adicionada junto aos solventes (caso sejam utilizados). Após o tempo de reação, o complexo CD-solvente é separado por centrifugação ou filtração, ressuspensionado

em água e dissolvido por aquecimento, o precipitado é então recuperado por centrifugação e o solvente removido por destilação. O produto é concentrado à vácuo e algumas vezes tratado com carvão ativado e cristalizado. Na ausência de solvente, a CGTase é inativada e glicoamilase é adicionada a fim de converter os produtos não cíclicos e sobras de substrato a glicose e maltose para facilitar a purificação. A solução é clarificada com o uso de carvão ativado e as CDs são concentradas e cristalizadas (ARMBRUSTER et al., 1969; SHIEH et al., 1997; GRÜLL et al., 2001; FDA, 2016; SAOKHAM et al., 2017).

Nos sistemas utilizando solventes orgânicos, tolueno, álcool etílico, acetonitrila ou acetona, são adicionados a reação para atuarem como agentes complexantes, precipitando seletivamente um dos tipos de CDs e direcionando a produção para a CD desejada (BIWER et al., 2002; LI et al., 2007). Para a produção de α -CD, 1-decanol é o mais utilizado, já a recuperação e a purificação da γ -CD são facilitadas por sua precipitação de forma complexada com 8-ciclo-hexadecen-1-ona (SAOKHAM et al., 2017). Na síntese livre de solventes, a proporção de cada uma das CDs é definida pela especificidade da CGTase utilizada, produzindo uma mistura de α -, β - e γ -CD (BIWER et al., 2002). No entanto, os processos posteriores, separam somente as CDs do restante das moléculas presentes na solução, não diferenciando entre elas. Assim, a escolha da enzima é que determina a seletividade da CD formada. Devido a sua menor solubilidade, a β -CD pode ser mais facilmente separada das demais por cristalização, porém, a purificação de α - e γ -CD exige complexas e onerosas etapas de cromatografia, com baixos rendimentos e presença de subprodutos (AMMERAAL, 1990; SHIEH et al., 1997; BIWER et al., 2002).

CDs produzidas sem o uso de agentes complexantes podem ser aplicadas na indústria de alimentos sem restrições, diferentemente daquelas produzidas em processos com solventes. Entretanto, a produção livre destes apresenta baixo rendimento e exige um processo de purificação mais complexo, uma vez que tem a etapa de cristalização dificultada devido a maior concentração de produtos secundários (BIWER et al., 2002). De acordo com Astray et al. (2009) a purificação de α - e γ -CDs aumenta consideravelmente o custo de produção, sendo assim, 97 % das CDs usadas no mercado são β -CDs (mais fácil de purificar).

É possível direcionar a produção para maior formação de um determinado tipo de CD nos processos sem solventes variando o substrato, as condições de reação e a origem da CGTase (VAN DER VEEN et al., 2000c; QI et al., 2005). Enzimas de diferentes fontes apresentam especificidades diferentes, no entanto, a maioria delas produz misturas de α - e β -CDs, sendo

raras as produtoras de γ -CD em quantidade equivalente (LI et al., 2007). Neste sentido, cresce o número de pesquisas utilizando técnicas de engenharia genética de proteínas com a finalidade de alterar a especificidade de produto de CGTases através da substituição de aminoácidos específicos do sítio ativo (WANG et al., 2013; HAN et al., 2014; XIE et al., 2014; YUE et al., 2014; BAN et al., 2015; HUANG et al., 2016; LI et al., 2016).

2.3 Imobilização de enzimas

Uma série de propriedades torna a utilização de enzimas vantajosa frente aos catalisadores convencionais. Estas apresentam elevada eficiência e alto grau de especificidade, o que garante que o rendimento da reação não seja reduzido em função de reações paralelas, evitando a formação de subprodutos. Além disso, ao contrário dos catalisadores químicos, enzimas geralmente operam em condições mais brandas de temperatura, pressão e pH, o que contribui para a economia de energia e para a redução de custos na indústria. Outra vantagem é que estes biocatalisadores não geram problemas de descarte, uma vez que são proteínas (SHELDON, 2007; RODRIGUES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013).

Apesar das vantagens, existem alguns impedimentos práticos para utilização de enzimas pela indústria. Entre eles, o elevado custo de sua produção e purificação; a instabilidade de suas estruturas fora de seu ambiente natural; sua sensibilidade as variações de pH e temperatura e ao acúmulo de substâncias inibidoras, muitas vezes seus próprios substratos e produtos, quando em altas concentrações. Sendo assim, tais características resultam em curto período de uso das mesmas, e, por operarem dissolvidas em soluções aquosas, sua recuperação para posterior reutilização é impossibilitada (HANEFELD et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011; BOLIVAR et al., 2016).

Neste contexto, a imobilização de enzimas surgiu, na segunda metade do século XX, como alternativa para contornar tais limitações. De acordo com Katchalski-Katzir (1993), o termo “enzimas imobilizadas” refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região do espaço com a retenção de suas atividades catalíticas, possibilitando que sejam usadas repetida e continuamente. Em regra, os sistemas de imobilização buscam estabilizar suas estruturas a fim de preservar suas atividades enzimáticas. Por consequência, em

comparação com enzimas livres, enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes as alterações reacionais (RODRIGUES et al., 2013).

O principal objetivo da imobilização é, portanto, possibilitar a reutilização da enzima por diversos ciclos de reação e, assim, reduzir os custos inerentes a sua utilização. Tal benefício só é alcançado através do aumento de sua estabilidade, da proteção de suas estruturas e da prevenção da dissociação de suas subunidades. Assim, consegue-se melhorar seu desempenho em condições não ideais; impedir que sejam carregadas para etapas subsequentes do processo; reduzir problemas de inibição ou ainda de inativação; e até mesmo modular sua seletividade ou especificidade (BRADY et al., 2009; GARCIA-GALAN et al., 2011). A heterogeneidade obtida pela imobilização, além de permitir fácil recuperação do biocatalisador, a torna apta para aplicação em uma variedade de modelos de reatores, permitindo processos de operação contínua e maior controle das reações (MATEO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013; SHELDON et al., 2013).

O primeiro relato relacionado à ligação de uma enzima em um suporte data de 1916 quando uma invertase foi ligada não intencionalmente a carvão vegetal por adsorção, mantendo sua atividade (NELSON et al., 1916). Já nos anos 50 foram, pela primeira vez, produzidas preparações enzimáticas imobilizadas por inclusão em matrizes poliméricas. Desde então, numerosos métodos de imobilização com a utilização de diferentes materiais, foram desenvolvidos (TISCHER et al., 1999) e esforços substanciais estão sendo dedicados para o aperfeiçoamento dos materiais de suporte, com o propósito de contribuir na preservação ou melhorar a atividade da enzima após imobilização (GUISAN, 2013), e também no conhecimento das estruturas enzimáticas como um todo, a fim de se ter maior controle na orientação da enzima durante sua ligação ao suporte (BARBOSA et al., 2015).

Para o desenvolvimento de um processo de imobilização adequado as propriedades e características da enzima e do suporte devem ser avaliadas, assim como, as condições de imobilização. Alguns dos parâmetros gerais a serem considerados quando se deseja aperfeiçoar um protocolo de imobilização de enzimas estão resumidos na **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3. Parâmetros críticos para o desenvolvimento de um protocolo de imobilização.

	Parâmetros a serem considerados	Exemplos
Suporte	Parâmetros químicos	Composição, grupos funcionais, estabilidade em solventes, hidrofobicidade, cargas na superfície.
	Parâmetros físicos	Morfologia, tamanho de partícula, porosidade (estrutura dos poros, tamanho e distribuição de poros), área superficial ativa, abrasividade, resistência mecânica.
Enzima	Propriedades bioquímicas	Estabilidade ao armazenamento, toxicidade, flexibilidade conformacional, tamanho e peso molecular, localização do sítio-ativo, morfologia, grupos funcionais e cargas na superfície, ponto isoelétrico.
	Parâmetros cinéticos	Atividade específica, perfis de pH e temperatura, estabilidade relacionada as condições de reação (pH, solventes e temperatura), aditivos estabilizantes e necessidade de cofatores.
Processo de imobilização	Estratégia de imobilização	Adsorção física, encapsulação, ligação covalente, ligação cruzada.
	Condições de imobilização	Temperatura, pH, solventes, agentes de estabilização.
	Difusão e transferência de massa	Efeito do tampão, viscosidade do meio de reação, difusão nos poros do suporte.
	Desempenho	Reusabilidade, recuperação do produto, inibição enzimática, cinéticas.
	Custos do processo	Custos da enzima e suporte, eliminação de resíduos, energia.

Fonte: Adaptado de Hartmann e Kostrov (2013).

De acordo com uma revisão crítica sobre o uso industrial de enzimas imobilizadas, desenvolvida por DiCosimo et al. (2013), dada a tendência atual da indústria em utilizar biocatalisadores em seus processos, combinada com a rápida evolução da tecnologia envolvida na área, a implementação de sistemas utilizando enzimas imobilizadas tende a crescer e sua aplicação na área de alimentos deve continuar a dominar em termos de volume.

2.3.1 Métodos para imobilização de enzimas

Idealmente, o método de imobilização deve garantir a estabilidade da enzima durante longos períodos de tempo, evitar sua lixiviação, torná-la reutilizável e permitir a livre difusão de substratos e produtos da reação (ISPAS et al., 2009). Com este propósito, diferentes métodos já foram desenvolvidos e são classificados como físicos, quando existem interações fracas entre o suporte e a enzima; e químicos, em que ligações covalentes são formadas (**Figura 2.9**).

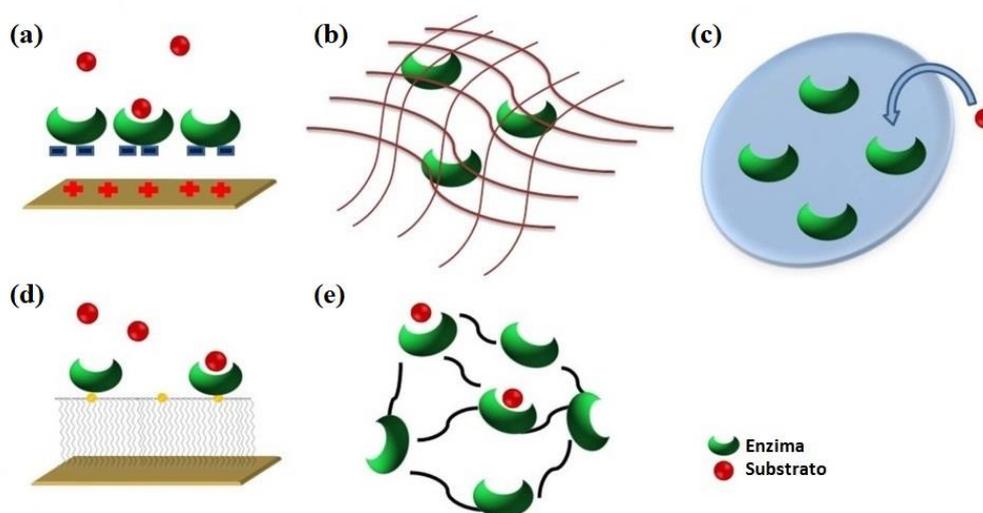


Figura 2.9. Representação dos principais métodos de imobilização: (a) adsorção, (b) aprisionamento, (c) encapsulamento, (d) ligação covalente e (e) reticulação. Fonte: adaptado de (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2015).

Aos métodos físicos pertencem a adsorção (física ou iônica) em uma matriz insolúvel em água; o aprisionamento em gel; a microencapsulação e a formação de filmes. Os métodos químicos de imobilização incluem a ligação covalente da enzima ao suporte e a reticulação desta pelo uso de um reagente multifuncional de baixa massa molecular. A partir destes, a literatura contempla diversas estratégias usando, inclusive, combinações especificamente desenvolvidas para um determinado suporte ou enzima na tentativa de conservar ou melhorar suas propriedades catalíticas (HANEFELD et al., 2009; SHELDON et al., 2013).

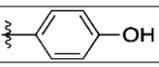
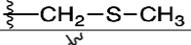
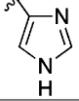
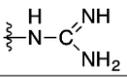
Resumidamente, a **Tabela 2.4** apresenta as vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização mais utilizados. Protocolos padrão para a imobilização covalente de enzimas são, em sua maioria, baseados em ligações não específicas, a partir de aminoácidos endógenos presentes na superfície das proteínas. A **Tabela 2.5** mostra alguns dos grupos químicos reativos que são explorados para imobilização covalente.

Tabela 2.4. Vantagens e desvantagens de diferentes métodos de imobilização.

Método de imobilização	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo custo, procedimento experimental rápido e simples; • Geralmente não necessita de funcionalização do suporte; • Solventes não tóxicos • Não altera a conformação da enzima; • Não desconfigura o sítio-ativo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Lixiviação da enzima do suporte durante a reação catalítica devido a mudanças nas condições de reação (temperatura, pH) ou através de forças mecânicas.
Ligação covalente	<ul style="list-style-type: none"> • Forte ligação da enzima ao suporte, que evita lixiviação da enzima do suporte; • Ampla possibilidade de ligantes orgânicos; • Métodos estabelecidos para funcionalização/ativação de suportes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Métodos mais complicados e caros; • Necessidade de funcionalização/ativação da superfície do suporte; • Uso de reagentes químicos tóxicos (ex.: glutaraldeído); • Redução ou perda de atividade catalítica resultante da alteração conformacional da enzima.
Reticulação e encapsulação	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilização de enzimas multiméricas; • Estabilização contra condições adversas de reação; • Alta pureza da enzima não é requerida; • Não ocorre lixiviação da enzima do suporte; • Diferentes enzimas podem ser co-imobilizadas; • Nenhuma ou mínima alteração conformacional da enzima. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimento experimental complicado (várias etapas são geralmente necessárias); • Uso de reagentes químicos tóxicos (glutaraldeído); • Decréscimo na taxa de difusão de substratos e produtos devido ao reduzido volume de poro.

Fonte: modificado de Hartmann e Kostrov (2013).

Tabela 2.5. Grupos funcionais reativos dos principais aminoácidos utilizados para imobilização.

Grupo reativo	Aminoácido	pK _a *
	Amina primária N-terminal ε-amina da lisina	7,8 10,5
	Ácido carboxílico C-terminal Ácido glutâmico Ácido aspártico	3,75 4,6 4,6
	Tiol Cisteína	8,8
	Hidroxila Serina Treonina	13,6
	Fenol Tirosina	9,6
	Tioéter Metionina	9,1
	Imidazol Histidina	7,0
	Guanidina Arginina	> 12

Fonte: adaptado de Steen Redeker et al. (2013).

*Valores médios de pK_a dos grupos ionizáveis das proteínas (DAMODARAN et al., 2010).

Aminas, ácidos carboxílicos e tióis são os principais alvos para a imobilização de enzimas. Os aminoácidos contendo ácido carboxílico em sua cadeia lateral (ácido glutâmico e ácido aspártico) constituem a maior fração entre os comumente encontrados na superfície das proteínas. Tais aminoácidos e a porção C-terminal podem reagir com aminas a fim de serem utilizados para ligação em suportes sólidos. Aminas e tióis atuam como nucleófilos para a formação de ligações, sendo que, as aminas primárias disponíveis para reação são encontradas em lisinas, que representam de 6 a 10 % dos aminoácidos de uma proteína. Presentes principalmente na superfície, elas são reativas sem a necessidade de ativação e apresentam boa estabilidade após ligação covalente. Já os grupos tióis (-SH), encontrados nas cisteínas, são mais reativos ($pK_a \sim 8$) que as aminas primárias de lisinas ($pK_a \sim 10,5$) em pH abaixo de 9,0. No entanto, como elas são encontradas prioritariamente na forma de cistinas, duas cisteínas ligadas entre si por ponte dissulfeto, necessitam de tratamento prévio com agentes redutores como ditioneitol (DTT) ou mercaptoetanol para serem usadas em imobilizações (BASLÉ et al., 2010).

Diversas metodologias estão disponíveis para promover interações entre estes grupos funcionais de enzimas e suportes, entre elas, a utilização de agentes bifuncionais que se ligam diretamente em aminoácidos endógenos promovendo a ligação da proteína ao suporte (BASLÉ et al., 2010). Entretanto, devido à grande ocorrência da maioria deles nas proteínas, a imobilização pelos aminoácidos naturais ocorre de forma aleatória entre as múltiplas possibilidades de ligação, impossibilitando seu direcionamento e, desta forma, podendo ocasionar modificações desfavoráveis na conformação da enzima (STEEN REDEKER et al., 2013). De acordo com Bolivar et al. (2016), a distorção conformacional da enzima é um dos principais fatores que levam à baixa recuperação da atividade catalítica após a imobilização. A adequada orientação da proteína é, portanto, uma condição crítica, especialmente quando esta possui substrato de elevada massa molecular, situação em que o suporte pode gerar impedimento estereoquímico e dificultar o reconhecimento pela enzima imobilizada (HERNANDEZ et al., 2011).

Devido à esta dificuldade de controlar a imobilização e frente a necessidade de se obter um derivado que mantenha as características reacionais da enzima, estratégias alternativas têm sido desenvolvidas a fim de direcionar sua ligação ao suporte. Uma abordagem mais específica envolve grupamentos da superfície da enzima, naturais ou modificados, que interagem com grupamentos devidamente introduzidos no suporte (BOLIVAR et al., 2016). Um exemplo disso

é a orientação molecular da enzima através de resíduos de cisteína. Devido à baixa ocorrência deste aminoácido nas proteínas, ele se torna um alvo interessante para imobilizações dirigidas. Assim como em pontes dissulfeto naturais, a ligação pode ser desfeita por agentes redutores e o suporte recuperado e reutilizado (STEEN REDEKER et al., 2013). Ademais, cisteínas podem ser introduzidas em regiões específicas da proteína, através de técnicas de mutagênese sítio dirigida, a fim de que a imobilização seja totalmente orientada pela sua posição (LIU et al., 2013). Assim, a combinação de tais técnicas possibilita a obtenção de um conjunto de derivados imobilizados por diferentes regiões da proteína a seleção daquele que melhor se adequar à aplicação desejada (GRAZÚ et al., 2010; GODOY et al., 2013).

Outros trabalhos exploram a seletividade de interações específicas que ocorrem naturalmente entre biomoléculas, como com avidina e biotina (HOLLAND-NELL et al., 2007), poli-histidinas adicionadas ao C ou N-terminal da proteína com íons metálicos divalentes (GANESANA et al., 2011), ou um marcador que se liga a um anticorpo (WANG et al., 2001), em sua maioria, adicionados à proteína de interesse por técnicas recombinantes. Devido à alta seletividade destas interações, é possível conhecer e orientar a ligação da proteína ao suporte (STEEN REDEKER et al., 2013; BARBOSA et al., 2015).

2.3.2 Sílicas como suportes para imobilização de enzimas

O processo de imobilização implica na interação entre a enzima e o suporte, que fornece diferentes propriedades químicas e mecânicas ao derivado. Assim, ao projetar um biocatalisador imobilizado, o foco inicial é selecionar o suporte adequado às condições de reação (pH, temperatura, agitação) e à enzima em si (hidrofobicidade, grupo funcional disponível para ligação, etc.) (TISCHER et al., 1999; HANEFELD et al., 2009).

Além de serem insolúveis no meio de reação, as características necessárias em um suporte para imobilização de enzimas incluem a disponibilidade de grupos funcionais para reagirem diretamente com elas ou para sofrerem modificações químicas de funcionalização e ativação, hidrofilicidade, estabilidade térmica, mecânica e química. Outro requisito desejado é possuir grande área superficial, o que pode ser conseguido com a utilização de materiais altamente porosos, com poros de dimensões suficientemente grandes para acomodar a enzima e não limitar a difusão de substratos e produtos (HANEFELD et al., 2009). Compreensivelmente, para alimentos, produtos farmacêuticos e aplicações médicas, a não

toxicidade e a biocompatibilidade dos materiais também são atributos requeridos. Ademais, para corresponder a crescente consciência ambiental, é interessante que sejam recicláveis ou biodegradáveis, além de serem econômicos (KRAJEWSKA, 2004; ISPAS et al., 2009).

Assim sendo, suportes para imobilização de enzimas são criados a partir de diferentes materiais como polímeros orgânicos sintéticos (Eupergit C, Amberlite, Sepabeads), biopolímeros (celulose, amido, agarose, quitosana e gelatina) e polímeros inorgânicos (sílicas e zeólitos) (SHELDON et al., 2013). Além das muitas opções existentes, outros suportes podem ser projetados para combinar com as propriedades de superfície da enzima escolhida e se adaptar à técnica requerida (CAO et al., 2003; CAO, 2005).

Silicatos porosos são materiais poliméricos promissores para a imobilização de enzimas já que proporcionam alta segurança toxicológica, estabilidade térmica e mecânica, o que os torna ideais para serem aplicados em diferentes tipos de reatores (HARTMANN et al., 2013; MAGNER, 2013; CARLSSON et al., 2014). Os suportes porosos, em geral, são associados com uma grande área superficial específica e a possibilidade de controlar o tamanho e a distribuição dos poros é uma importante característica das sílicas. Poros de diâmetros demasiado pequenos perdem a capacidade de carga e deixam de conferir proteção às enzimas, que ficarão imobilizadas somente em seu exterior. Da mesma forma, poros excessivamente grandes não proporcionarão proteção por as deixarem livres para interagir com possíveis inibidores presentes no meio e sujeitas à forças de cisalhamento (HOFFMANN et al., 2006; HUDSON et al., 2008). Todavia, tais configurações devem ser projetadas de acordo com a aplicação a que se destinam.

Sílicas produzidas a partir da hidrólise e policondensação de tetraetilortosilicato (TEOS) ou tetrametilortosilicato (TMOS) possuem grupos silanos (Si-OH) livres que podem ser funcionalizados, antes ou após sua síntese, com organosilanos que se ligam covalentemente, introduzindo diferentes grupos funcionais ao suporte (HARTMANN et al., 2010; HARTMANN et al., 2013; ZHOU et al., 2013). Dois exemplos mais comuns de organosilanos usados para funcionalização é o 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS), resultando em grupos amino na superfície, e o 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTMS) que adiciona grupos tióis ao suporte (HARTMANN et al., 2013). Desta forma, o suporte de sílica pode ser quimicamente modificado para conter variados grupos funcionais e se adequar à imobilização de uma enzima em particular (**Figura 2.10**) (SULEK et al., 2010; MAGNER, 2013; SANTOS et al., 2015).

Adicionalmente, estes suportes inorgânicos são possíveis de serem caracterizados quanto à sua estrutura de poros, morfologia da partícula e composição química, o que permite, inclusive, acompanhar o processo de funcionalização, ativação e imobilização da enzima. Uma combinação de técnicas analíticas é utilizada para tal finalidade. Difração de raios X (XRD), analisa a estrutura intermolecular do suporte, indicando se este é hexagonal, cúbico, lamelar ou possui estrutura distorcida. O tamanho da partícula e sua morfologia podem ser visualizados por microscopia eletrônica de varredura (SEM - Scanning Electron Microscopy). A área de superfície, volume e distribuição do tamanho de poros são geralmente determinados por análise de adsorção física de nitrogênio (N₂). Revestindo o suporte com uma fina camada de nitrogênio (ou outro gás inerte) e aplicando o método de Brunauer-Emmet-Teller (BET), baseado na lei universal dos gases, a área superficial pode ser quantificada. Após a saturação dos poros do suporte pelo gás, o volume de poros e a distribuição de seus tamanhos podem ser determinados aplicando-se o método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) (YEWLE et al., 2012; CARLSSON et al., 2014).

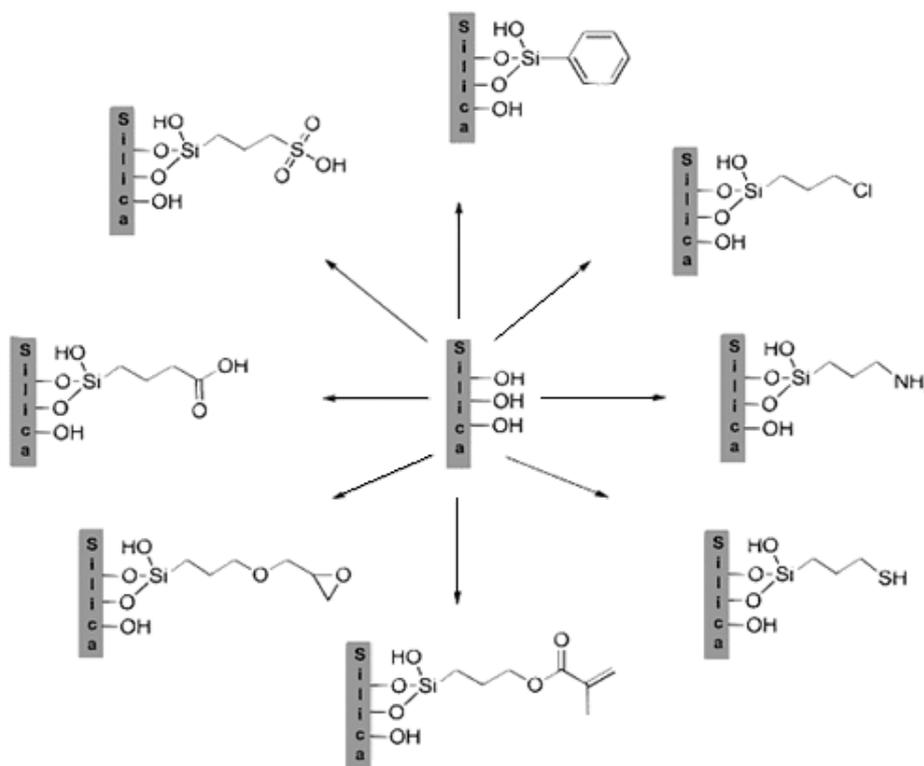


Figura 2.10. Grupos funcionais possíveis de serem adicionados à superfície da sílica (HARTMANN et al., 2013).

2.3.3 Imobilização de ciclodextrina glicosiltransferases

Devido à importância de seus produtos de reação, a enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) tem sido o foco de diversos trabalhos de imobilização (GRAEBIN et al., 2016). Diferentes métodos já foram avaliados para a imobilização desta enzima, entre eles, a adsorção iônica e hidrofóbica, o aprisionamento em gel e a ligação covalente, o mais frequente entre eles (MARTÍN et al., 2003; RHA et al., 2005; TARDIOLI et al., 2006; AMUD et al., 2008).

O método de adsorção foi avaliado para a imobilização de CGTases em diversos tipos de suportes, a grande maioria apresentando baixos valores de eficiência. Sobral et al. (2002) utilizaram a adsorção iônica em suporte de quitosana e obtiveram uma recuperação de 3,6 %. Uma CGTase de *Bacillus macerans* com cauda de 10 lisinas no C-terminal foi imobilizada por adsorção em resina de troca catiônica (SP-Sepharose), apresentando estabilização da enzima em pHs mais alcalinos. Avaliada quanto a estabilidade operacional em reator de leito fixo, a enzima imobilizada perdeu 10 % de sua atividade inicial em 10 dias de operação contínua a 25 °C e pH 7,0 (KWEON et al., 2005; RHA et al., 2005). Eficiências mais altas foram alcançadas pela imobilização por adsorção iônica (20,1 %) e hidrofóbica (5,2 %) em nanoesferas de sílica com núcleo magnético (IBRAHIM et al., 2014). Embora com rendimento satisfatório (76 %), a adsorção hidrofóbica em Octadecyl-Sepabeads também apresentou baixa recuperação da atividade (3,83 %) e evidenciou um dos principais inconvenientes do método: a fácil lixiviação da enzima mesmo em baixa força iônica (25 % de dessorção em tampão 10 mmol L⁻¹) (AMUD et al., 2008). Prousoontorn e Pantatan (2007) compararam a eficiência de imobilização por adsorção e por ligação covalente obtendo valores de 0,4 e 16,5 % em alumina; 20,6 e 15,6 % em sílica; 3,8 e 6,1 % em quitosana, 0,4 e 2,7 % em carvão ativado, respectivamente.

Também através de método físico de imobilização, uma CGTase de *Thermoanaerobacter* sp. foi encapsulada em matriz sol-gel com 6,94 % de recuperação da atividade de ciclização. No entanto, a temperatura ótima para atividade caiu de 80-90 °C para aproximadamente 60 °C e, em relação ao pH, os autores observaram uma queda abrupta em valores próximos ao seu ótimo, o que não ocorre com a enzima na forma livre. Além disso, o tempo de meia vida do derivado imobilizado foi de aproximadamente 100 min, estando praticamente inativado após 3 h a 60 °C. Os resultados destacados demonstram que possivelmente ocorreram alterações em sua estrutura tridimensional durante sua encapsulação, tornando-a menos resistente às alterações do meio (AMUD et al., 2008), embora esta enzima

seja conhecida pela sua alta termoestabilidade (JØRGENSEN et al., 1997; MATTE et al., 2012).

Entre os métodos químicos de imobilização, para CGTases destaca-se a ligação covalente, em suportes como sílica, quitosana, filmes de polietileno e agarose (LEE et al., 1991; SOBRAL et al., 2002; SOBRAL et al., 2003; MATTE et al., 2012; SCHÖFFER et al., 2013). A imobilização covalente em esferas de quitosana mediada pelo agente bifuncional glutaraldeído apresentou 6,1 % de eficiência para 20 mg/g de suporte, aumentou a temperatura ótima de ciclização de 75 para 85 °C, mantendo o pH ótimo em 5,0. O derivado reteve 61 % de sua atividade operacional após 100 ciclos de uso e 100 % após 100 h de uso contínuo em reator de leito fixo (SCHÖFFER et al., 2013). Em outro trabalho, a CGTase ligada em quitosana teve o pH e a temperatura ótima deslocados de pH 7,5 e 55 °C para pH 8,5 e 60 °C. Além disso, não foi observado aumento da estabilidade ao pH, enquanto a estabilidade térmica foi melhorada com a imobilização (YANG et al., 1989). Comparando a imobilização covalente de uma CGTase de *Paenibacillus* sp. em diferentes suportes, Prousoontorn et al. (2007) observaram eficiências de 6,1 % em quitosana, 2,7 % em carvão ativado, 15,6 % em sílica e 16,5 % para alumina. O pH ótimo da CGTase imobilizada em alumina foi deslocado de 6,0 para 7,0 enquanto que a temperatura ótima permaneceu inalterada (60 °C). As CGTases livre e imobilizada apresentaram perfil de estabilidade ao pH semelhante, porém a estabilidade térmica da enzima imobilizada foi 20 % maior.

Ligações covalentes multipontuais em grânulos reticulados de glioxil-agarose melhoraram a estabilidade à temperatura mantendo 90 % da atividade inicial da CGTase após 5 h de reação a 85 °C e ainda alterou a temperatura ótima de ciclização de 80-85 °C para aproximadamente 90 °C. A atividade recuperada foi de 32,4 % e os autores apontam a dificuldade de acesso do substrato de alto peso molecular ao sítio ativo da enzima como responsável pela perda de atividade no processo. Durante o trabalho foi observado o aumento de 17,5 % da seletividade da enzima para a produção de β -CD em detrimento a γ -CD. Os autores também destacam a importância da obtenção de um biocatalisador termoestável para aplicação em processos contínuos de produção devido à possibilidade de evitar contaminação microbiológica em altas temperaturas (TARDIOLI et al., 2006).

Esferas acrílicas macroporosas de metacrilamida (Eupergit C) com diferentes quantidades de grupos epóxi reativo e tamanhos de poros variados, foram usadas por Martin et al. (2003) para ligação covalente de uma CGTase. A imobilização aumentou a estabilidade

térmica da enzima, que manteve 40 % da atividade inicial após 10 ciclos de 24 h cada. A recuperação da atividade enzimática foi de 10,2 % em Eupergit C e 4,8 % em Eupergit C 250L, sendo melhor no suporte com maior quantidade de grupos reativos (600 e 200 $\mu\text{mol/g}$) e de poros menores ($< 500 \text{ \AA}$ e $1000\text{-}1000 \text{ \AA}$). Para ligações covalentes, suportes de sílica também tem sido desenvolvidos com frequência para imobilização de CGTases, exemplos são sílica-glioxil (AMUD et al., 2008), sílicas de poros controlados (TARDIOLI et al., 2000) e sílica com núcleo magnético (IBRAHIM et al., 2014), alcançando eficiências de 1,54; 2,5 e 6,6 %, respectivamente. Sílica mesoporosa funcionalizada com APTMS e ativada com glutaraldeído foi utilizada como suporte por Matte et al. (2012), obtendo um dos melhores valores de rendimentos de imobilização (83 %) e recuperações de atividade (73 %) relatados até agora para CGTase.

Em suma, CGTases imobilizadas geralmente apresentam maior resistência às mudanças de conformações causadas por condições desnaturantes, tornando-se mais resistentes a variações de pH e temperatura (ABDEL-NABY, 1999; MARTÍN et al., 2003; TARDIOLI et al., 2006). Embora alguns trabalhos relatem a obtenção de boas eficiências de imobilização (73 % em sílica macroporosa (MATTE et al., 2012), 32 % em glioxil-agarose (TARDIOLI et al., 2006), 25 % em resina de troca iônica (NAKAMURA et al., 1977)), a grande maioria das imobilizações de CGTases apresenta valores abaixo de 10 % (TARDIOLI et al., 2006; GRAEBIN et al., 2016), sendo este o principal obstáculo a ser superado para imobilização desta enzima.

2.4 Reatores enzimáticos

Reatores enzimáticos podem ser operados em modo descontínuo (bateladas) ou contínuo (**Figura 2.11**). A obtenção de biocatalisadores heterogêneos, através da imobilização proporciona maior estabilidade às enzimas e permite sua utilização em sistemas contínuos e, desta forma, os benefícios deste modo de processamento podem ser explorados, entre eles, o aumento da produtividade e a consequente diminuição dos custos de preparo e utilização das mesmas (EŞ et al., 2015; BOLIVAR et al., 2016). Quando utilizadas em modo de batelada, as enzimas imobilizadas são recuperadas ao final do processo para serem reutilizadas subsequentemente até que sejam inativadas e precisem ser substituídas (ILLANES et al., 2008).

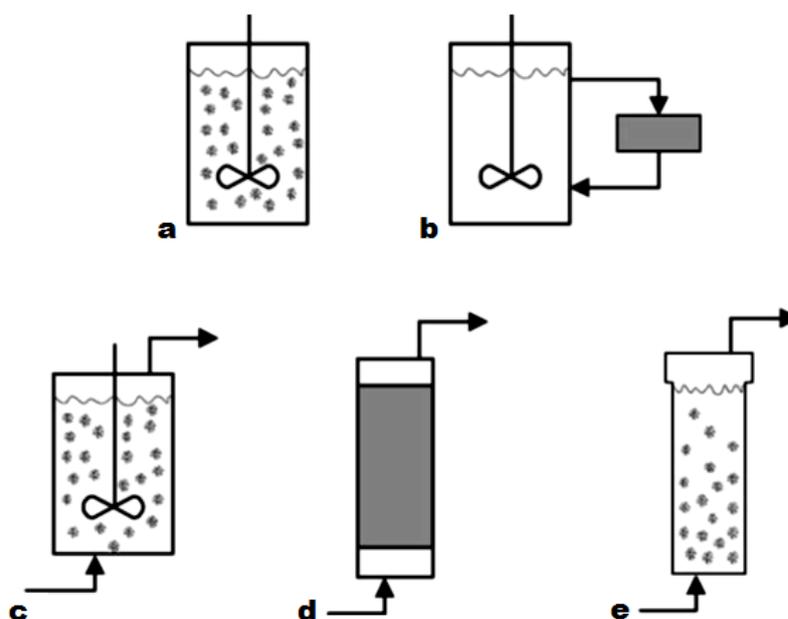


Figura 2.11. Diferentes configurações de reatores para enzimas imobilizadas. Sistemas descontínuos: (a) batelada, (b) batelada com recirculação. Sistemas contínuos: (c) tanque agitado contínuo, (d) contínuo de leito fixo, (e) contínuo de leito fluidizado. Fonte: adaptado de Illanes e Altamirano (2008).

Diferentes configurações de reatores podem ser usadas em processos enzimáticos. Reatores de tanque agitado, providos de sistemas para controle de pH e temperatura são empregados, principalmente, em processos com enzimas solúveis. No caso de serem utilizados para reações com enzimas imobilizadas, um dispositivo é incluído para mantê-las no reator durante a retirada do produto. Em reatores de batelada com circulação, a enzima é embalada em um leito através do qual o meio de reação é recirculado até alcançar a conversão desejada (ILLANES et al., 2008; EŞ et al., 2015).

Em operações contínuas com enzimas imobilizadas, a configuração mais utilizada é a de reator de leito fixo, onde a enzima é mantida em uma coluna enquanto o substrato passa através dela. Uma variação desta é quando o leito é fluidizado dentro da coluna, mantendo as partículas num balanço entre a força gravitacional e o fluxo de substrato que é adicionado pela parte inferior do reator (MARRAZZO et al., 1975; VERHOFF et al., 1981).

Para que a máxima performance do biocatalizador seja alcançada, é essencial o uso de um reator adequado. Reatores de leito fixo, por exemplo, podem ser a melhor escolha considerando-se parâmetros cinéticos, no entanto, as condições de reação são difíceis de serem controladas quando a escala é aumentada. Por outro lado, se o biocatalisador imobilizado for

sensível à compressão, o leito fixo pode não ser adequado por permitir compactação e, se sensível a forças de cisalhamento, não é indicado o uso de reator agitado em virtude do atrito gerado (ILLANES et al., 2008).

Svensoon e Adlercreutz (2011) utilizaram uma CGTase imobilizada em reator de leito fixo para a conversão de α -CD em *n*-dodecil-(1,4)- β -maltooctaosídeo e descrevem a possibilidade de controlar entre as reações de acoplamento e/ou desproporcionalização de modo a formar predominantemente o produto de interesse, simplesmente variando o fluxo do substrato no reator. A fim de comparar a produção de CDs entre sistemas descontínuo e contínuo, Tardioli et al. (2000) utilizaram uma CGTase imobilizada em sílica e relatam elevada produtividade em reator de leito fluidizado, no qual foi possível atingir, em 4 minutos de residência a mesma quantidade de CDs normalmente produzida com enzima livre após 24 h de reação em reator descontínuo. Também foi observado um aumento da seletividade da enzima para produção de 82 % de β -CD, com concentrações de 11,8 g L⁻¹ de β -CD e 2,9 g L⁻¹ de γ -CD.

A alta estabilidade de uma CGTase de *Thermoanaerobacter* sp., preservada pela imobilização covalente da enzima em esferas de quitosana possibilitou seu uso em reator de leito fixo, mantendo 100 % de sua atividade inicial após 100 h de uso contínuo. A concentração de substrato em 4 % maximizou a produção de β -CD (1,36 g L⁻¹) em fluxo de 3 mL min⁻¹ (SCHÖFFER et al., 2013). Com sua imobilização em esferas de alginato-gelatina, Rakmai e Cheirsilp (2016) obtiveram uma CGTase de *Bacillus* sp. C26 altamente estável, que foi utilizada em um estudo comparativo entre dois tipos de reatores contínuos: reator de tanque agitado (CSTR) e reator de leito fixo (PBR). A taxa de produção máxima aparente para a reação em CSTR (0,5742 g L⁻¹ h⁻¹) foi maior do que em PBR (0,33 g L⁻¹ h⁻¹) provavelmente devido a maior taxa de transferência de massa em CSTR. Além destes, foi desenvolvido um sistema integrando os dois tipos de reatores (PBR e CSTR), melhorando o rendimento da reação e, consequentemente a concentração final de β -CD de 15,3 % e 6,10 g L⁻¹ em CSTR para 26,5 % e 10,6 g L⁻¹. Além disso, a CGTase imobilizada apresentou boa estabilidade operacional durante 96 h de uso contínuo. Assim, o sistema desenvolvido pode contribuir grandemente para o desenvolvimento da produção industrial de β -CD. Os autores ainda discorrem sobre as vantagens do processo contínuo, que envolve economia de tempo e custos para a limpeza após cada lote e, evita a variação da qualidade do produto em cada ciclo.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados obtidos no decorrer deste trabalho de pesquisa estão apresentados na sequência, em forma de artigos científicos, seguindo as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA-UFRGS). Cada artigo traz os materiais e métodos utilizados em seu desenvolvimento, juntamente com os resultados, as discussões e conclusões pertinentes a cada etapa do mesmo.

O primeiro artigo contempla a imobilização da enzima CGTase através de duas diferentes abordagens com a finalidade de direcionar sua ligação ao suporte e, assim, avaliar a contribuição de diferentes posições do sítio ativo na recuperação da atividade após imobilização. Em seguida, o biocatalisador imobilizado foi avaliado quanto à sua estabilidade operacional em reator de leito fixo. Este artigo está publicado no periódico *Process Biochemistry*, 58, p.120-127, 2017. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.04.041.

O segundo artigo relata a possibilidade de modulação da produção das três ciclodextrinas (α -, β - e γ -CD) em função de variações das condições de reação (temperatura, pH e tempo) inclusive de modo contínuo em reator de leito fixo. Este artigo está publicado no periódico *Carbohydrate Polymers*, 169, p.41-49, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.04.005.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhou-se com uma CGTase comercial (Toruzyme®) classificada como β -CGTase em virtude de que, nas condições padrões de análise, esta enzima em particular forma β -CD em maior proporção (JØRGENSEN et al., 1997). A imobilização desta enzima tem sido, em geral, uma forma eficiente de estabilizá-la e possibilitar sua reutilização, aumentando assim a produtividade do biocatalisador. Entretanto, a recuperação da atividade enzimática costuma ser baixa, provavelmente devido a nova conformação da enzima e a orientação não adequada do sítio ativo, dificultando o acesso do substrato.

Uma sílica mesoporosa foi utilizada na produção de suportes funcionais para imobilização covalente da CGTase. Funcionalizada com grupos amino e ativada com glutaraldeído, a Si-NH possibilitou a ligação covalente com grupos aminos presentes na enzima. Contendo grupos tióis, a Si-SH permitiu a imobilização dirigida ao único resíduo de cisteína presente na proteína, via ligação dissulfeto. Estas duas abordagens foram utilizadas para direcionar a imobilização da CGTase ao suporte, proporcionando orientações diferenciadas do sítio ativo.

Possivelmente devido à facilidade de acesso ao amino terminal da enzima, maiores rendimentos de imobilização foram obtidos utilizando a Si-NH, entretanto, a Si-SH proporcionou uma imobilização com eficiência quatro vezes maior (11,91 %) do que com a imobilização via grupamento amino (2,86 %). No entanto, a enzima imobilizada ao suporte por grupamentos aminos apresentou maior atividade enzimática em faixas mais amplas de pH e temperatura e maior estabilidade operacional. Diante de pesquisas atuais demonstrando que lisinas apresentam pKa variável de acordo com o microambiente em que se encontram, a proximidade com o suporte poderia propiciar tal comportamento levando a ligações multipontuais com aminas de lisinas vizinhas ao amino terminal da enzima, o que explicaria a melhor estabilização da enzima diante deste tipo de imobilização. Uma distorção da estrutura tridimensional da enzima ao ser ligada por diferentes pontos poderia também explicar, em parte, a baixa eficiência alcançada.

A estabilidade dos dois tipos de ligação foi avaliada de forma contínua utilizando os derivados em reator de leito fixo. O derivado Si-NH-G-CGTase apresentou estabilidade operacional elevada, preservando 100 % de sua atividade inicial durante 200 h de uso. Apesar de o derivado Si-SH-CGTase manter apenas 40 % de sua atividade durante este mesmo tempo, o suporte pôde ser recarregado apenas pela circulação de nova solução enzimática e reutilizado por igual período. Assim, é possível alcançar maior produtividade total com este suporte.

Na sequência, o suporte Si-NH foi funcionalizado com três diferentes concentrações de APTMS, obtendo-se suportes com quantidades diferenciadas de grupamentos amino, que possibilitaram a imobilização de maior quantidade de enzima, com eficiências de imobilização entre 3,41 e 5,37 % e atividade enzimática variando entre 6333 e 10173 U g⁻¹ de sílica. O derivado imobilizado de maior atividade enzimática foi então utilizado para avaliação da produção de ciclodextrinas.

Variando temperatura, pH e tempo de reação, inicialmente em bateladas, observou-se a possibilidade de obtenção de diferentes proporções de α -, β - e γ -CDs. Notou-se que a produção de ciclodextrinas foi influenciada especialmente pelo tempo de reação. Em tempos curtos, as concentrações de α - e β -CDs foram maiores que as de γ -CD para enzima livre (2.5 mg mL⁻¹ de α -CD, 2.2 mg mL⁻¹ de β -CD e 1.3 mg mL⁻¹ de γ -CD a 50 °C e pH 7.0) e imobilizada (3.9 mg mL⁻¹ de α -CD, 3.4 mg mL⁻¹ de β -CD e 0.7 mg mL⁻¹ de γ -CD a 70 °C e pH 7.0). Com maiores tempos de reação as concentrações de α - e β -CDs decresceram e a quantidade de γ -CD aumentou alcançando valores de 2.1 mg mL⁻¹ com a enzima livre (70 °C, pH 7.0) e 2.96 mg mL⁻¹ com a enzima imobilizada (70 °C, pH 4.0). Além disso, a própria imobilização da enzima alterou as proporções de α -, β - e γ -CDs.

Para mensurar o efeito combinado das variáveis temperatura, pH e tempo de reação na produção das CDs foi realizado um planejamento composto central que apontou todos os efeitos lineares como estatisticamente significativos. O tempo de reação apresentou o maior efeito para todas as CDs, sendo negativo para α - e β -CD, indicando que com o aumento do tempo ocorre uma redução da concentração de ambas. Do contrário, esta variável teve efeito positivo para a produção de γ -CD. O pH teve efeito positivo para α - e β -CD e negativo para γ -CD, significando que pH mais alcalinos favorecem a produção de β -CD, enquanto que maiores quantidades de γ -CD são obtidas em condições mais ácidas. Entre os tratamentos avaliados, a 90 °C, pH 6,0 e 24 h foi obtida a maior concentração de α -CD (4,93 mg mL⁻¹), enquanto para β -CD as melhores

condições de produção foram 58 °C, pH 7,2 e 9,9 h (3,63 mg mL⁻¹). Por outro lado, a maior obtenção de γ -CD ocorreu em pH 4, 70 °C e 24 h (3,52 mg mL⁻¹).

Ao ser avaliada em reator contínuo, confirmou-se a importância do tempo de reação e a possibilidade de utilizar um sistema contínuo para a modulação da produção de CDs. Apesar da redução no rendimento de CDs totais, tempos maiores de reação produziram quase exclusivamente γ -CD (0,75 mg mL⁻¹ de α -CD e 3,36 mg mL⁻¹ de γ -CD) a 70 °C, pH 8,0 e 141 min. Apesar de já haverem trabalhos relatando alterações na especificidade de CGTases com diferentes pHs, tampões e tempos de reação, não há o relato da produção de γ -CD ser favorecida.

Concluiu-se então que os resultados obtidos ao longo deste estudo evidenciaram a importância da imobilização para a estabilização das estruturas enzimáticas. Uma vez conferida a estabilização, os derivados podem ser utilizados em diferentes condições de reação a fim de modular o perfil de produtos gerados. Além disso, a possibilidade de serem aplicados em sistemas contínuos, através de reatores enzimáticos, aumenta a produtividade alcançada com o biocatalizador o que reduz custos inerentes à sua utilização. Desta forma, da mesma maneira como ocorre com outras enzimas, o uso de CGTases imobilizadas tem a vantagem de produzir CDs de forma mais econômica, por poder ser utilizada em muitos ciclos de reação. Assim, o aumento no volume de produção e a consequente redução dos preços deste produto podem viabilizar sua utilização, nas mais diversas áreas, onde estas encontram possibilidade de aplicação. Tais conclusões são de essencial importância quando se trata do desenvolvimento de tecnologias que permitem o avanço na obtenção de aditivos naturais com ampla perspectiva de aplicação na indústria alimentícia. Particularmente, no caso das CDs, existe no Brasil grande motivação para o desenvolvimento de métodos de produção devido à disponibilidade do substrato amido.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Além dos resultados apresentados, o estudo realizado abre caminhos para o aperfeiçoamento das técnicas de produção de CDs através de CGTases imobilizadas:

- ✓ Testar o uso de espaçadores entre a enzima e o suporte como uma forma de facilitar o acesso do substrato ao sítio ativo;
- ✓ Utilizar suporte de sílica funcionalizado com diferentes grupos reativos a fim de, após imobilização pela cisteína, estabelecer ligações multipontuais com o objetivo de melhorar a estabilidade operacional;
- ✓ Avaliar o uso da CGTase imobilizada em reatores de leito fluidizado com recirculação a fim de aumentar a conversão do substrato em CDs;
- ✓ Testar diferentes fontes de amido como substrato para a produção de CDs;
- ✓ Dar continuidade ao desenvolvimento de uma CGTase com mutações em aminoácidos de posições específicas a fim de, posteriormente, orientar a imobilização da enzima;
- ✓ Avaliar o efeito da exposição diferenciada do sítio-ativo para a recuperação da atividade após a imobilização da enzima;
- ✓ Purificar, imobilizar e caracterizar a enzima recombinante quanto a cinética de produção de CDs e a parâmetros de imobilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD RAHMAN, R. et al. Optimisation of growth medium for the production of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* HR1 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2053-2060, Oct 29 2004. ISSN 1359-5113.

ABDEL-NABY, M. A. Immobilization of *Paenibacillus macerans* NRRL B-3186 cyclodextrin glucosyltransferase and properties of the immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 399-405, 1999.

ALONSO, L. et al. Use of β -cyclodextrin to decrease the level of cholesterol in milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 863-869, 2009. ISSN 0022-0302.

ALONSO, L. et al. Industrial application of β -cyclodextrin for manufacturing low cholesterol butter. **Milchwissenschaft**, v. 65, n. 1, p. 36-37, 2010.

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

AMMERAAL, R. N. **Separation and purification of gamma cyclodextrin**: Google Patents 1990.

AMUD, A. E. et al. Methods and supports for immobilization and stabilization of cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1-3, p. 189-201, Mar 2008. ISSN 0273-2289.

ANDREU-SEVILLA, A. J. et al. Comparative effect of the addition of α -, β -, or γ -cyclodextrin on main sensory and physico-chemical parameters. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p. S347-S353, 2011. ISSN 1750-3841.

ARMBRUSTER, F. C.; KOOI, R. **Production of cyclodextrin**: Google Patents 1969.

ARORA, A.; DAMODARAN, S. Removal of soy protein-bound phospholipids by a combination of sonication, β -cyclodextrin, and phospholipase A2 treatments. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1007-1013, 2011. ISSN 0308-8146.

ASTRAY, G. et al. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631-1640, Oct 2009. ISSN 0268-005X.

ASTRAY, G. et al. Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1212-1218, May 2010. ISSN 0963-9969.

AVCI, A.; DÖNMEZ, S. A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 36-42, Jan 2009. ISSN 1359-5113.

AYTAC, Z. et al. Release and antibacterial activity of allyl isothiocyanate/ β -cyclodextrin complex encapsulated in electrospun nanofibers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 120, p. 125-131, 2014. ISSN 0927-7765.

BAE, H. Y.; KIM, S. Y.; KWAK, H. S. Comparison of cholesterol-reduced Camembert cheese using cross-linked β -cyclodextrin to regular Camembert cheese during storage. **Milchwissenschaft**, v. 63, n. 2, p. 153-156, 2008.

BAN, X. et al. Mutations at calcium binding site III in cyclodextrin glycosyltransferase improve β -cyclodextrin specificity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 76, p. 224-229, 2015/05/01/ 2015. ISSN 0141-8130.

BARÁNKOVÁ, E.; DOHNAL, V. Effect of additives on volatility of aroma compounds from dilute aqueous solutions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 407, n. 15, p. 217-223, 2016. ISSN 0378-3812.

BARBOSA, O. et al. Strategies for the one-step immobilization - purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435-456, 2015. ISSN 0734-9750.

BASLÉ, E.; JOUBERT, N.; PUCHEAULT, M. Protein chemical modification on endogenous amino acids. **Chemistry & Biology**, v. 17, n. 3, p. 213-227, 2010. ISSN 1074-5521.

BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 609-617, Sep 2002. ISSN 0175-7598.

BOLIVAR, J. M.; EISL, I.; NIDETZKY, B. Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts. **Catalysis Today**, v. 259, Part 1, n. 1, p. 66-80, 2016. ISSN 0920-5861.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009. ISSN 0141-5492.

BRASIL. **RDC Nº 2, de 2007 - Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes**. ANVISA 2007.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217-226, 2005. ISSN 1367-5931.

CAO, L. Q.; VAN LANGEN, L.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387-394, Aug 2003. ISSN 0958-1669.

CARLSSON, N. et al. Enzymes immobilized in mesoporous silica: a physical-chemical perspective. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, p. 339-360, 2014. ISSN 0001-8686.

COLEMAN, A. W. et al. Aggregation of cyclodextrins: an explanation of the abnormal solubility of β -cyclodextrin. **Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry**, v. 13, n. 2, p. 139-143, 1992. ISSN 1573-1111.

CONTE, J. A.; STAUFFER, K. R. **Free fatty acid removal from used frying fat**: Google Patents 1996.

COSTA, P. et al. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three *Lamiaceae* species. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 341-346, 2015. ISSN 0926-6690.

CRAVOTTO, G. et al. Cyclodextrins as food additives and in food processing. **Current Nutrition & Food Science**, v. 2, n. 4, p. 343-350, 2006. ISSN 1573-4013/2212-3881.

CRINI, G. Review: A history of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 10940-10975, 2014/11/12 2014. ISSN 0009-2665.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900.

DE BIE, A. T. H. J.; VAN OMMEN, B.; BÄR, A. Disposition of [^{14}C] γ -cyclodextrin in germ-free and conventional rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 150-158, 1998/04/01 1998. ISSN 0273-2300.

DE VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010. ISSN 0958-6946.

DECOCK, G. et al. Experimental and theoretical study on the inclusion compounds of aroma components with β -cyclodextrins. **Supramolecular Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 477-482, 2006/09/01 2006. ISSN 1061-0278.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, May 31 2004. ISSN 0032-9592.

DIAS, H. M. A. M. et al. Butter cholesterol removal using different complexation methods with beta-cyclodextrin, and the contribution of photoacoustic spectroscopy to the evaluation of the complex. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1104-1110, 2010. ISSN 0963-9969.

DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437-6474, 2013. ISSN 0306-0012.

DORĐEVIĆ, V. et al. Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 452-490, 2015. ISSN 1866-7929.

ELLOUZE, F.; BEN AMAR, N.; DERATANI, A. Large ring cyclodextrins: Synthesis, purification and applications. **Comptes Rendus Chimie**, v. 14, n. 10, p. 967-971, 2011.

EPA. **Alpha-cyclodextrin, beta-cyclodextrin, and gamma-cyclodextrin; exemption from the requirement of a tolerance**. AGENCY, E. P.: US Federal Register 2005. 70, 128: 38780-38785 p. 2005.

EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065-2082, 2015. ISSN 1432-0614.

FDA. GRAS notice 000046: gamma-Cyclodextrin. 2000. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm261675.pdf>>. Acesso em: 01/05/2017.

FDA. GRAS notice 000074: beta-Cyclodextrin. 2001. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm261320.pdf>>. Acesso em: 01/05/2017.

FDA. GRAS notice GRN 155: alpha-Cyclodextrin. 2004. Disponível em: < <https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm533094.pdf> >. Acesso em: 01/05/2017.

FDA. GRAS Notice 678: Alpha-cyclodextrin. 2016.

FENYVESI, É.; VIKMON, M.; SZENTE, L. Cyclodextrins in food technology and human nutrition: benefits and limitations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 12, p. 1981-2004, 2016/09/09 2016. ISSN 1040-8398.

GANESANA, M. et al. Site-specific immobilization of a (His)₆-tagged acetylcholinesterase on nickel nanoparticles for highly sensitive toxicity biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 30, n. 1, p. 43-48, 2011. ISSN 0956-5663.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, Nov 2011. ISSN 1615-4150.

GODOY, C. A. et al. Changes on enantioselectivity of a genetically modified thermophilic lipase by site-directed oriented immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 87, p. 121-127, Mar 2013. ISSN 1381-1177.

GOH, P. H.; ILLIAS, R. M.; GOH, K. M. Domain replacement to elucidate the role of B domain in CGTase thermostability and activity. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2123-2130, 2012a. ISSN 1359-5113.

GOH, P. H.; ILLIAS, R. M.; GOH, K. M. Rational mutagenesis of cyclodextrin glucanotransferase at the calcium binding regions for enhancement of thermostability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 5307-5323, May 2012b. ISSN 1661-6596.

GOMES, L. M. M. et al. Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β -cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. **Food Chemistry**, v. 148, p. 428-436, 2014. ISSN 0308-8146.

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 3, p. 276-290, 2010. ISSN 0168-3659.

GRAEBIN, N. et al. Immobilization of glycoside hydrolase families GH1, GH13, and GH70: State of the art and perspectives. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1074, 2016. ISSN 1420-3049.

GRAY, J. I.; ROBERTS, D. G. Retention and release of volatile food flavour compounds. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 5, n. 3, p. 231-239, 1970. ISSN 1365-2621.

GRAZÚ, V. et al. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 390-398, 2010. ISSN 1359-5113.

GRÜLL, D.; STIFTER, U. **Process for the production of cyclodextrin**: Google Patents 2001.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells 3**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2013.

HAN, R. et al. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 415-428, 2014. ISSN 0734-9750.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009. ISSN 0306-0012.

HARADA, A. Preparation and structures of supramolecules between cyclodextrins and polymers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 148, p. 115-133, 1996/02/01 1996. ISSN 0010-8545.

HARADA, A. Construction of supramolecular structures from cyclodextrins, polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 3, p. 183-188, 1997/12/20 1997. ISSN 0144-8617.

HARANGI, J. et al. The digestable parent cyclodextrin. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 73, n. 1, p. 335-339, 2012. ISSN 1573-1111.

HARTMANN, M.; JUNG, D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 844-857, Feb 7 2010. ISSN 0959-9428.

HARTMANN, M.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas - benefits and challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6277-6289, 2013. ISSN 0306-0012.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 107-122, Feb 8 2011. ISSN 0141-0229.

HOFFMANN, F. et al. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 45, n. 20, p. 3216-3251, 2006 2006. ISSN 1433-7851.

HOLLAND-NELL, K.; BECK-SICKINGER, A. G. Specifically immobilised aldo/keto reductase AKR1A1 shows a dramatic increase in activity relative to the randomly immobilised enzyme. **ChemBiochem**, v. 8, n. 9, p. 1071-6, Jun 18 2007. ISSN 1439-4227 (Print)

1439-4227 (Linking).

HUANG, M. et al. Double mutations enhance β -cyclization activity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2016/12/14/ 2016. ISSN 1381-1177.

HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in mesoporous silicates. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 47, n. 45, p. 8582-8594, 2008 2008. ISSN 1433-7851.

IBRAHIM, A. S. S. et al. Cyclodextrin glucanotransferase immobilization onto functionalized magnetic double mesoporous core-shell silica nanospheres. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 55-64, 2014. ISSN 0717-3458.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C. Enzyme reactors. In: (Ed.). **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. Chile: Springer Netherlands, 2008. cap. 5, p.205–251. ISBN 978-1-4020-8360-0.

ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 543-554, Jan 2009. ISSN 1618-2642.

JECFA. **List of codex specifications for food additives**: 9 p. 2013.

JEON, S.-S. et al. Comparative study of flavor, texture, and sensory in cream cheese and cholesterol-removed cream cheese. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 159-165, 2012.

JEONG, H. J. et al. Cholesterol removal from whole egg by crosslinked β -cyclodextrin. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 4, p. 537-542, 2014. ISSN 1011-2367.

JØRGENSEN, S. T. et al. Cloning and nucleotide sequence of a thermostable cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Thermoanaerobacter* sp. ATCC 53627 and its expression in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 10, p. 1027-1031, 1997. ISSN 1573-6776.

KARANGWA, E. et al. Improving blended carrot-orange juice quality by the addition of cyclodextrins during enzymatic clarification. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2612-2617, 2012. ISSN 1935-5149.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes - learning from past successes and failures. **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 471-478, 1993. ISSN 0167-7799.

KFOURY, M. et al. Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 264-272, 2015. ISSN 0144-8617.

KIM, S. H.; AHN, J.; KWAK, H. S. Crosslinking of β -cyclodextrin on cholesterol removal from milk. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 11, p. 1183-1187, 2004. ISSN 1976-3786.

KLEIN, C.; SCHULZ, G. E. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0-Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 217, n. 4, p. 737-750, Feb 20 1991. ISSN 0022-2836.

KONDO, H.; NAKATANI, H.; HIROMI, K. In vitro action of human and porcine α -amylases on cyclomalto-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 204, p. 207-213, 1990/09/05 1990. ISSN 0008-6215.

KONNO, A. et al. Bitterness reduction of naringin and limonin by β -Cyclodextrin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 2203-2208, 1982/09/01 1982. ISSN 0002-1369.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, Aug 2004. ISSN 0141-0229.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167-180, 2013. ISSN 0378-5173.

KWEON, D. H. et al. Immobilization of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase fused with poly-lysine using cation exchanger. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 571-578, Mar 2 2005. ISSN 0141-0229.

LEE, Y.-H.; LEE, S.-H.; SHIN, H.-D. Performance of column type bioreactor packed with immobilized cyclodextrin glucanotransferase for cyclodextrin production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 63-69, 1991.

LI, C. et al. Calcium ion contribution to thermostability of cyclodextrin glycosyltransferase is closely related to calcium-binding site CaIII. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 37, p. 8836-8841, 2013/09/18 2013. ISSN 0021-8561.

LI, Z. et al. Mutations enhance β -cyclodextrin specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 112-117, 2014a. ISSN 0144-8617.

LI, Z. et al. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, n. 2, p. 151-160, 2014b. ISSN 0924-2244.

LI, Z. et al. Asp577 mutations enhance the catalytic efficiency of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 111-116, 2016/02/01/ 2016. ISSN 0141-8130.

LI, Z. et al. Gamma-cyclodextrin: A review on enzymatic production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 2, p. 245-255, Nov 2007. ISSN 0175-7598.

LIMA, P. S. S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, n. 20, p. 965-987, 2016.

LINDE, G. A. et al. Taste modification of amino acids and protein hydrolysate by α -cyclodextrin. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 814-818, 2009. ISSN 0963-9969.

LIU, Y. et al. Molecular orientation of enzymes attached to surfaces through defined chemical linkages at the solid-liquid interface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 34, p. 12660-12669, Aug 28 2013. ISSN 0002-7863.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 1-11, Feb 1 2007. ISSN 0378-5173.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C. et al. Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 3, p. 380-386, 2011. ISSN 0260-8774.

LÓPEZ-NICOLÁS, J. M. et al. Effects of addition of α -cyclodextrin on the sensory quality, volatile compounds, and color parameters of fresh pear juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9668-9675, 2009/10/28 2009. ISSN 0021-8561.

LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; BRU, R.; GARCÍA-CARMONA, F. Enzymatic Oxidation of Linoleic Acid by Lipoxygenase Forming Inclusion Complexes with Cyclodextrins as Starch Model Molecules. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1144-1148, 1997/04/01 1997. ISSN 0021-8561.

LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; GARCÍA-CARMONA, F. Use of cyclodextrins as secondary antioxidants to improve the color of fresh pear juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6330-6338, 2007/07/01 2007. ISSN 0021-8561.

MAGNER, E. Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6213-6222, 2013 2013. ISSN 0306-0012.

MALANGA, M. et al. "Back to the Future": A new look at hydroxypropyl beta-cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2921-2931, 2016. ISSN 0022-3549.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313-326, Sep-Oct 2010. ISSN 0882-5734.

MARRAZZO, W. N.; MERSON, R. L.; MCCOY, B. J. Enzyme immobilized in a packed-bed reactor: kinetic parameters and mass transfer effects. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, n. 10, p. 1515-1528, 1975. ISSN 1097-0290.

MARSHALL, J. J.; MIWA, I. Kinetic difference between hydrolyses of gamma-cyclodextrin by human salivary and pancreatic alpha-amylases. **Biochim Biophys Acta**, v. 661, n. 1, p. 142-7, 1981. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking).

MARTÍN, M. T. et al. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 21, n. 4-6, p. 299-308, Feb 17 2003. ISSN 1381-1177.

MARTINA, K. et al. Recent applications of cyclodextrins as food additives and in food processing. **Current Nutrition & Food Science**, v. 9, n. 3, p. 167-179, 2013.

MASKOOKI, A. M. et al. Effect of cholesterol removal processing using β -cyclodextrin on main components of milk. **International Journal of Food Science**, v. 2013, p. 6, 2013.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, May 2 2007. ISSN 0141-0229.

MATTE, C. R. et al. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on silica microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as a “spacer arm”. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 51–56, 2012. ISSN - 1381-1177.

NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K. Production of schardinger β -dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, n. 1, p. 87-99, 1977. ISSN 1097-0290.

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, n. 5, p. 1109-1115, 1916/05/01 1916. ISSN 0002-7863.

PRANCKUTE, R. et al. Development of synbiotics with inulin, palatinose, alpha-cyclodextrin and probiotic bacteria. **Pol J Microbiol**, v. 63, n. 1, p. 33-41, 2014. ISSN 1733-1331 (Print)
1733-1331 (Linking).

PROUSOONTORN, M. H.; PANTATAN, S. Production of 2-O-alpha-glucopyranosyl β -ascorbic acid from ascorbic acid and beta-cyclodextrin using immobilized cyclodextrin glycosyltransferase. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 57, n. 1-4, p. 39-46, Apr 2007. ISSN 0923-0750.

QI, Q. S.; MOKHTAR, M. N.; ZIMMERMANN, W. Effect of ethanol on the synthesis of large-ring cyclodextrins by cyclodextrin glucanotransferases. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 95-99, Apr 2007. ISSN 0923-0750.

QI, Q. S.; ZIMMERMANN, W. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 5, p. 475-485, Feb 2005. ISSN 0175-7598.

RAKMAI, J.; CHEIRSILP, B. Continuous production of β -cyclodextrin by cyclodextrin glycosyltransferase immobilized in mixed gel beads: Comparative study in continuous stirred tank reactor and packed bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, Part A, n. 15, p. 107-113, 2016. ISSN 1369-703X.

REINECCIUS, T. A.; REINECCIUS, G. A.; PEPPARD, T. L. Encapsulation of flavors using cyclodextrins: comparison of flavor retention in alpha, beta, and gamma types. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 9, p. 3271-3279, 2002. ISSN 1750-3841.

REINECCIUS, T. A.; REINECCIUS, G. A.; PEPPARD, T. L. Utilization of β -cyclodextrin for improved flavor retention in thermally processed foods. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 1, p. FCT58-FCT62, 2004. ISSN 1750-3841.

REIS, S. et al. Molecular inclusion process of urease inhibitors into cyclodextrins: a theoretical study. **Chemical Physics Letters**, v. 675, p. 69-74, 2017. ISSN 0009-2614.

RHA, C. S. et al. Production of cyclodextrin by poly-lysine fused *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on cation exchanger. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 34, n. 1-6, p. 39-43, Jul 1 2005. ISSN 1381-1177.

RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2216-2238, Sep 2011. ISSN 1615-4150; 1615-4169.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2013.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. M. et al. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 21-45, 2015. ISSN 0165-9936.

SAHA, B. C.; ZEIKUS, J. G. Cyclodextrin degrading enzymes. **Starch - Stärke**, v. 44, n. 8, p. 312-315, 1992. ISSN 1521-379X.

SANTOS, J. C. S. D. et al. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413-2432, 2015. ISSN 1867-3899.

SAOKHAM, P.; LOFTSSON, T. γ -Cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1-2, p. 278-292, 2017. ISSN 0378-5173.

SCHÖFFER, J. D. N. et al. Continuous production of β -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1311-1316, 2013. ISSN 0144-8617.

SCHWARZER, J. et al. **Compositions of sugar-containing sterol solids dispersions**: Google Patents 2011.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, Jun 2007. ISSN 1615-4150.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013. ISSN 0306-0012.

SHIEH, W.; HEDGES, A. **Purification of beta cyclodextrin**: Google Patents 1997.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 5-6, p. 341-359, Dec 2002. ISSN 0734-9750.

SIRO, I. et al. Release of alpha-tocopherol from antioxidative low-density polyethylene film into fatty food simulant: influence of complexation in beta-cyclodextrin. **Food Addit Contam**, v. 23, n. 8, p. 845-53, 2006. ISSN 0265-203X (Print)

0265-203X (Linking).

SOBRAL, K. A. et al. Evaluation of supports and methods for immobilization of enzyme cyclodextringlycosyltransferase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p. 809-819, Spr 2003. ISSN 0273-2289.

SOBRAL, K. C. A. et al. Immobilization of cyclodextringlycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus firmus* in commercial chitosan. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 44, n. 1, p. 383–386, 2002. ISSN 0923-0750.

SPEARS, J. K. et al. Pullulans and gamma-cyclodextrin affect apparent digestibility and metabolism in healthy adult ileal cannulated dogs. **J Nutr**, v. 135, n. 8, p. 1946-52, 2005. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking).

STEEN REDEKER, E. et al. Protein engineering for directed immobilization. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, n. 11, p. 1761-1777, 2013/11/20 2013. ISSN 1043-1802.

SULEK, F. et al. Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, n. 2, p. 179-185, Jan 2010. ISSN 0304-8853.

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122-1144, 2017. ISSN 0753-3322.

SVENSSON, D.; ADLERCREUTZ, P. Immobilisation of CGTase for continuous production of long-carbohydrate-chain alkyl glycosides control of product distribution by flow rate adjustment. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 69, n. 3-4, p. 147-153, May 2011. ISSN 1381-1177.

SVENSSON, D.; ULVENLUND, S.; ADLERCREUTZ, P. Efficient synthesis of a long carbohydrate chain alkyl glycoside catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 5, p. 854-861, Dec 1 2009. ISSN 0006-3592.

SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 575-587, Apr 1997. ISSN 0959-9428.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, Jul-Aug 1998. ISSN 0009-2665.

SZEJTLI, J.; SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, n. 3, p. 115-125, Oct 2005. ISSN 0939-6411.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 17-28, 1999. ISSN 0169-409X.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 3-4, p. 137-142, 2004. ISSN 0924-2244.

TARDIOLI, P. W.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F. Production of cyclodextrins in a fluidized-bed reactor using cyclodextrin-glycosyl-transferase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1003-1019, 2000.

TARDIOLI, P. W.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F. Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomaltodextrin glucanotransferase immobilized on glyoxyl-agarose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1270-1278, Oct 3 2006. ISSN 0141-0229.

TERADA, Y. et al. Cyclodextrins are not the major cyclic alpha-1,4-glucans produced by the initial action of cyclodextrin glucanotransferase on amylose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 25, p. 15729-15733, Jun 20 1997. ISSN 0021-9258.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 326-335, Aug 1999. ISSN 0167-7799.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 8, p. 678-686, Jun 1998. ISSN 0141-0229.

UITDEHAAG, J. C. M. et al. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a gamma-cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-angstrom resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 49, p. 34868-34876, Dec 1999. ISSN 0021-9258.

UITDEHAAG, J. C. M. et al. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α -amylase family. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 3, p. 295-304, 2002. ISSN 0141-0229.

VAN DER MAAREL, M. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, Mar 28 2002. ISSN 0168-1656.

VAN DER VEEN, B. A. et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 2, p. 336-360, Dec 29 2000a. ISSN 0167-4838.

VAN DER VEEN, B. A. et al. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase alpha-cyclodextrin production. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, n. 4, p. 1027-1038, Mar 3 2000b. ISSN 0022-2836.

VAN DER VEEN, B. A. et al. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 3, p. 658-665, Feb 2000c. ISSN 0014-2956.

VERHOFF, F. H.; SCHLAGER, S. T. Enzyme activity maintenance in packed-bed reactors via continuous enzyme addition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 1, p. 41-60, 1981. ISSN 1097-0290.

WANG, J.; BHATTACHARYYA, D.; BACHAS, L. G. Improving the activity of immobilized subtilisin by site-directed attachment through a genetically engineered affinity tag. **Fresenius J Anal Chem**, v. 369, n. 3-4, p. 280-5, Feb 2001. ISSN 0937-0633 (Print)

0937-0633 (Linking).

WANG, J. et al. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1680-1685, 2011. ISSN 0308-8146.

WANG, L. et al. Enhanced production of γ -cyclodextrin by optimization of reaction of γ -cyclodextrin glycosyltransferase as well as synchronous use of isoamylase. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3072-3076, 2013. ISSN 0308-8146.

WEN, P. et al. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. **Food Control**, v. 59, p. 366-376, 2016. ISSN 0956-7135.

WHO. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants, α -cyclodextrin.** WHO Food Additives Series. Vol. 48: pp. 111–127 p. 2002.

WHO. Summary and conclusions of the sixty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2004.

XIE, T. et al. Site-saturation mutagenesis of central tyrosine 195 leading to diverse product specificities of an α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. 602-1. **Journal of Biotechnology**, v. 170, n. 20, p. 10-16, 2014. ISSN 0168-1656.

YAMAMOTO, K.; ZHANG, Z. Z.; KOBAYASHI, S. Cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase degrades intact granules of potato raw starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 962-966, Mar 2000. ISSN 0021-8561.

YANG, C.-P.; SU, C.-S. Study of cyclodextrin production using cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 283-294, 1989. ISSN 1097-4660.

YANG, L.-J. et al. Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with β -cyclodextrin or its derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 861-869, 2013. ISSN 0144-8617.

YEWLE, J. N. et al. Oriented immobilization of proteins on hydroxyapatite surface using bifunctional bisphosphonates as linkers. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 6, p. 1742-1749, Jun 2012. ISSN 1525-7797.

YUE, Y. et al. Enhancement of α -cyclodextrin product specificity by enriching histidines of α -cyclodextrin glucanotransferase at remote subsite -6. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 230-236, 2014. ISSN 1359-5113.

ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 3894-3912, 2013. ISSN 0306-0012.

OUTRAS PUBLICAÇÕES

- **Artigos publicados**

Graebin, N., Schöffler, J., et al. (2016). "**Immobilization of Glycoside Hydrolase Families GH1, GH13, and GH70: State of the Art and Perspectives.**" *Molecules* **21**(8): 1074. DOI: 10.3390/molecules21081074.

Abstract

Glycoside hydrolases (GH) are enzymes capable to hydrolyze the glycosidic bond between two carbohydrates or even between a carbohydrate and a non-carbohydrate moiety. Because of the increasing interest for industrial applications of these enzymes, the immobilization of GH has become an important development in order to improve its activity, stability, as well as the possibility of its reuse in batch reactions and in continuous processes. In this review, we focus on the broad aspects of immobilization of enzymes from the specific GH families. A brief introduction on methods of enzyme immobilization is presented, discussing some advantages and drawbacks of this technology. We then review the state of the art of enzyme immobilization of families GH1, GH13, and GH70, with special attention on the enzymes β -glucosidase, α -amylase, cyclodextrin glycosyltransferase, and dextransucrase. In each case, the immobilization protocols are evaluated considering their positive and negative aspects. Finally, the perspectives on new immobilization methods are briefly presented.

Duarte, L. S., Schöffler, J., et al. (2016). "**A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β -galactosidase**". *Process Biochemistry*, v.55, p. 96-103, 2017. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.01.015.

Abstract

A new bioprocess for the synthesis of lactosucrose was studied using a covalently immobilized β -galactosidase on macrospheres of chitosan. The effects of temperature and pH on the production of lactosucrose and other oligosaccharides were evaluated. At 30 °C and pH

7.0, the maximum concentration of lactosucrose reached to 79 g L^{-1} . The change of the reaction conditions allowed to modify the qualitative profile of the final products without quantitative change in the total of oligosaccharides produced. At pH 7 and $30 \text{ }^\circ\text{C}$, products profile was 79 g L^{-1} of lactosucrose, 37 g L^{-1} of galactooligosaccharides and 250 g L^{-1} of total oligosaccharides, while at pH 5 and $64 \text{ }^\circ\text{C}$ the concentrations for the same compounds were 40, 62 and 250 g L^{-1} , respectively. The immobilization increased the thermal stability up to 260-fold. Using 300 g L^{-1} of sucrose and 300 g L^{-1} of lactose, and 8.5 mg mL^{-1} of chitosan, 30 cycles of reuse were performed and the biocatalyst kept the maximal lactosucrose synthesis. These results fulfill some important aspects for the enzyme immobilization and oligosaccharides synthesis: the simplicity of the protocols, the high operational stability of the enzyme and the possibility of driving the final products.

- **Participação em trabalho de mestrado com artigo submetido para publicação**

Ricardi, Natália Carminatti; “Desenvolvimento de suportes porosos de sílica e suportes híbridos de sílica/quitosana para aplicação em catálise enzimática”. 2016. (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- **Trabalho apresentado em congresso**

Kringel, D.; Schöffner, J.N.; Baranzelli, J.; Vanier, N. L.; Dias, A.R.G.; Zavareza, E.; “Cyclodextrins production from rice starches with different levels of amylose”. The 1st Food Chemistry Conference – Shaping the Future of Food Quality, Health and Safety. Amsterdam. 30 October-1 November, 2016.

Abstract

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides consisting of nonreducing 6, 7 or 8 D-glucose units (α , β , and γ -cyclodextrin, respectively) produced by enzymatic modification of starch. The CDs are widely used in the formation of inclusion complexes and as encapsulating agents due to its structure characterized by their hydrophobic internal cavity and hydrophilic outer surface. The proportion of amylose and amylopectin of starch can influence the enzymatic susceptibility of the starch; however, to our knowledge, there was no reports in the literature

that demonstrate the influence of amylose content in the production of cyclodextrins. The aim of this study was to evaluate the influence of rice starch amylose in the production of cyclodextrins.

Starches were isolated from Moti, IRGA 406, and IRGA 407 rice cultivars, which exhibited 8 %, 21 % and 32 % of amylose, respectively. Cyclodextrins were produced at two starch concentrations (1 % and 10 %) by using cyclodextrin glycosyl transferase enzyme. Total cyclodextrin content was determined by reducing sugar content. The concentration of α , β , and γ -cyclodextrins was determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

The lowest starch concentration of 1 % resulted in a lower reducing sugar content and a higher degree of β -CD. On the other hand, the highest starch concentration of 10 % provided higher γ -CD levels.

The 21 % amylose rice starch exhibited 5.4 and 12.9 mg of CD per mL at 1 % and 10 % concentrations, respectively, which was the highest levels between the studied starches. Moreover, the higher degree of conversion of starch to cyclodextrins was determined in 21 % amylose rice starch.

The starch with the highest amylose content of 32 % exhibited the highest level of reducing sugars, and, consequently, the lower concentrations of cyclodextrins. Therefore, both the starch concentration and the amylose content influence the production of cyclodextrins.

