

APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE MATRIZES INORGÂNICAS PREPARADAS PELO PROCESSO SOL-GEL PARA IMOBILIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS *KLEBSIELLA OXYTOCA*

¹Marcos Vinicius Isaias Lima; ²Leandro da Silva Clementino; ³José Eduardo Gonçalves.

RESUMO: microorganismos em sua grande variedade desempenham funções como componentes fundamentais de cadeias alimentares, ciclos biogeoquímicos, assim ajudam as plantas no seu crescimento, adaptação e desenvolvimento. As bactérias isoladas identificadas como *Klebsiella oxytoca*, foram submetidas a ensaios visando quantificar a produção de ácido indolacético (AIA) em meio de cultura NFb-malato suplementado com triptofano. No Brasil, há um forte incentivo para a produção de CDs a baixo custo, devido à grande disponibilidade e facilidade de obtenção do substrato amido, sendo que o seu emprego na produção das CDs agregará valor a esta matéria-prima. Os extratos dos sobrenadantes das culturas, incubados por diversos períodos de tempo, foram submetidos à análise espectrofotométrica para quantificação do AIA. As cepas de *Klebsiella oxytoca* produziram AIA e β -CD em maior porcentagem quando imobilizadas com matrizes produzidas no processo sol-gel.

PALAVRAS-CHAVE: *Klebsiella oxytoca*, processo sol-gel, AIA, β -ciclodextrinas.

1 INTRODUÇÃO

O processo sol-gel oferece uma versatilidade na formação dos compostos, principalmente por possibilitar a síntese de sistemas multicomponentes em que a estequiometria, tamanho de partículas, poros, microestrutura e homogeneidade podem ser muito bem controladas. Dentre os compostos de constituição simples, utilizados para a preparação de novos materiais via processo sol-gel, destacam-se os alcóxidos, sendo mais particularmente conhecidos os dos elementos silício, alumínio, zircônio e titânio, largamente empregados (AIROLD, FARIAS, 2004; DUTOIT *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, óxidos binários do tipo SiO_2/MxOy , TiO_2/MxOy preparados pelo processo sol-gel também têm sido utilizados com o propósito de obter materiais com características diversas. Gel ou xerogel preparados por esse método são considerados novos materiais com utilização em diversos fins, por apresentarem alta área superficial e oferecerem a possibilidade de reagir com ácidos de Brønsted, resultando num ácido imobilizado altamente disperso (GONÇALVES *et al.*, 1999).

¹ Acadêmico do Curso Biomedicina - Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do PROBIC/FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA-Cesumar (PROBIC-Cesumar). marcos_viniciusbr@hotmail.com

² Acadêmico do Curso Biomedicina - Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do PROBIC/FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA-Cesumar (PROBIC-Cesumar). leandro_mga18@hotmail.com

³ Docente do CESUMAR. Departamento de Farmácia do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. jegoncal@cesumar.br

A imobilização de enzimas e células microbianas é um setor com ampla aplicação industrial devido à maior facilidade de armazenamento e vida útil do biocatalisador. As reações realizadas com enzimas e microrganismos suportados apresentam vantagens sobre as condições tradicionais (não suportadas), pois são mais facilmente processadas, permitem processos contínuos e diminuem o número de operações unitárias necessárias nas indústrias (QUINTANA *et al.*, 1999).

Atualmente métodos usuais de imobilização são baseados em quatro técnicas alternativas: encapsulamento em matriz polimétrica, adsorção em superfície, ligação covalente em suportes sólidos insolúveis em água e ligação química cruzada com reagentes bifuncionais. Devido ao alto grau de variabilidade individual inerente aos sistemas biológicos não existe um método genérico e ideal para todo o universo dos microrganismos e reações de interesse (BIECKERSTAFF, 1997).

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade genética e desempenham funções como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos assim ajudam as plantas no seu crescimento, adaptação e desenvolvimento. Muitos destes microrganismos são encontrados no espaço densamente enraizado do solo (rizosfera) e se aproveitam das excreções radiculares da planta que lhe serve como fonte de nutrientes, e estes, em adversidade e atividade microbiana do solo constituem fatores importantes na sustentabilidade dos ecossistemas. Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 2% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos, e isto não é feito apenas em bases morfológicas, mas também com métodos genéticos, bioquímicos e fisiológicos (PRIMAVESI, 1982; NÓBREGA, *et al.*, 2004; GONÇALVES, 2002).

Sabe-se que o gênero *Klebsiella* e outros grupos de bactérias RPCP produzem e liberam um largo espectro de substâncias reguladoras de crescimento de plantas, como auxinas, diversas giberelinas e citocininas. Entre as auxinas, o ácido indolacético (AIA) é o mais comum, as quais são conhecidas por estimular uma resposta rápida levando ao aumento do alongamento celular e outra de longa duração estimulando a divisão e diferenciação celular nas plantas (EL-KHAWAS *et al.*, 1999; BEYELER *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

As ciclodextrinas (CDs) são maltooligossacarídeos cíclicos constituídos por um número variável de unidades de glicose, unidos por ligação α -1,4. As mais comuns são constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente α -CD, β -CD e γ -CD. As vantagens em potencial do uso e da disponibilidade das CDs vêm tendo papel decisivo no crescente interesse pelas mesmas. Elas são usadas em alimentos, fármacos, cosméticos, indústria têxtil, indústria de papel, tecnologia química, química analítica, entre outros processos (MATIOLI, 2000).

As CDs são produzidas, usualmente, a partir do amido pela reação de ciclização das cadeias lineares de glucopiranosose pela enzima ciclodextrina flicosiltransferase (CGTase). No Brasil, há um forte incentivo para a produção de CDs a baixo custo, devido à grande disponibilidade e facilidade de obtenção do substrato amido, sendo que o seu emprego na produção das CDs agregará valor a esta matéria-prima (MATIOLI, 2000).

Os sistemas com células imobilizadas têm sido amplamente revisado e aplicados em diversos processos biotecnológicos. Sua aplicação oferece vantagens, tais como a habilidade em separar a massa celular no final do processo para posterior reutilização, facilitando as operações descontínuas. Também melhoram as características dos processos contínuos, quando da necessidade de operação por um período prolongado, aumentando a produtividade do reator (ABDEL-NABY *et al.*, 2000).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Crescimento da *Klebsiella oxytoca*

A inoculação da *Klebsiella oxytoca* em estudo será realizada pela transferência de um inoculo com alça de platina para o meio líquido NFb malato livre de nitrogênio mineral e mantido em agitador rotatório (120 rpm) à 28° C por 168 horas. As células bacterianas serão centrifugadas (5000 rpm) e lavadas duas vezes com 25 mL de solução tampão (NaHPO₄.7 H₂O / KH₂PO₄, 0,1 mol L⁻¹ pH 7) estéril.

2.1.2 Preparação do meio NFb malato

Para a preparação de 1000 mL do meio NFb malato será utilizado: 5,0g de ácido málico; 0,5g de K₂HPO₄; 0,2g de MgSO₄.7H₂O; 0,1g de NaCl; 0,02g de CaCl₂.2H₂O; 2mL de solução micronutriente; 2mL de azul de bromotimol 0,2%; 4mL de solução FeEDTA; 1mL de solução de vitaminas e 4,5g de KOH. Ajustar o pH para 6,5-6,8 com NaOH e completar o volume para 1000mL com água destilada.

Para a produção da solução de micronutrientes 1000mL utilizar: 0,04g de CuSO₄.5H₂O; 1,20g de ZnSO₄.7H₂O; 1,40g de H₃BO₃; 1,0g de Na₂MoO₄.2H₂O; 1,75g de MnSO₄.H₂O. Completar o volume para 1000mL de água destilada.

Preparação de solução de vitaminas (1000mL) utilizar: 10mg de biotina (B1); 20mg de piridoxol-HCl. Dissolver em banho-maria e completar o volume para 1000mL com H₂O destilada.

2.1.4 Imobilização dos microrganismos nas matrizes inorgânicas

A imobilização das bactérias serão realizadas em enlenmeyer (250 mL) contendo água destilada estéril (50 mL), células integras do microrganismo previamente lavadas (ca. 1,2g, peso úmido) e as matrizes inorgânicas (0,6g) esterilizada. A suspensão resultante será agitada a 120 rpm, mantendo-se a temperatura em 28°C. Após 12 horas o sólido será filtrado.

Uma parte do material imobilizado será estocada em recipientes estéreis sob refrigeração para testar sua estabilidade e verificar a manutenção da sua atividade biocatalítica após períodos de estocagem (MARSALOLI *et al*, 2001).

2.1.5 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após a adsorção das bactérias nas matrizes inorgânicas, os materiais serão colocados em presença de uma solução tampão (NaHPO₄.7 H₂O / KH₂PO₄, 0,1 mol L⁻¹ pH 7) contendo 2,5% de glutaraldeído por 24 horas. Após este período as soluções sobrenadantes serão descartadas e os materiais lavados três vezes com soluções etanólicas de 30%, 50%, 70%, 90% e 100% consecutivamente. O mesmo procedimento será realizado com as células bacterianas não imobilizadas.

O material permanecerá em etanol absoluto até a realização do ponto crítico, utilizando CO₂ líquido à alta pressão.

2.1.6 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras para micrografia serão colocadas sobre a superfície de uma fita dupla face aderida ao porta-amostra de alumínio. Para as micrografias das matrizes inorgânicas, das células bacterianas livres e imobilizadas será depositada uma camada fina de ouro, através de um metalizador Shimadzu.

As micrografias serão obtidas em um microscópio eletrônico de varredura "Shimadzu". A tensão de aceleração utilizada para as amostras biológicas será de 15 KeV e para a matriz inorgânica de 20 KeV.

2.1.7 Quantificação do ácido indolacético em *Klebsiella oxytoca* imobilizada nas matrizes inorgânicas

Amostras isoladas e imobilizadas de *Klebsiella oxytoca* serão cultivadas em meio líquido NFb malato livre de nitrogênio mineral, ao qual foi adicionado o triptofano ($100\mu\text{g.mL}^{-1}$), os isolados serão cultivados a 28°C com agitação por um período de tempo variando de 24 à 168 horas. Após cada um destes períodos os meios de cultura serão centrifugados, a seguir a 1 mL dos sobrenadantes serão adicionados 2 mL do reativo de Salkowski e depois de 25 minutos será realizado a leitura em um espectrofotômetro Varian a 530 nm. O AIA será utilizado como padrão na concentração de 10 - 100100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os sobrenadantes das culturas em diferentes tempos de incubação serão alcalinizados a pH 6,8 e extraído com acetato de etila. A fração aquosa resultante será acidificada a pH 2,8 e extraída com acetato de etila. As frações orgânicas ácida e básica serão analisadas separadamente por cromatografia líquida de alta eficiência (EL-KAWA, 1999).

2.1.8 Determinação de β -CD

A concentração de β -CD é medida pela descoloração de uma solução de fenolfataleína a 550 nm, a qual ocorre depois da complexação com β -CD.

De acordo com a Teoria da Complexação (HAMON & MORAES, 1990), que leva em consideração a constante de equilíbrio ($K_{\beta\text{-CD}}$), a concentração da solução de fenolfataleína ($a = 0,00005\text{ M}$), a absorvância das amostras (ABS) e de uma solução isenta de β -CD (ABS_0), a equação para calcular a concentração de β -CD é a que segue:

$$C_{\beta\text{-CD}} = 6000 \times a \left(1 - \frac{\text{ABS}}{\text{ABS}_0} \right) \times \left[1 + \frac{\text{ABS}_0}{(K_{\beta\text{-CD}} \times a \times \text{ABS})} \right]$$

A curva padrão deve ser preparada com uma solução de β -CD 1 mM e a leitura, em espectrofotômetro a 550 nm, utilizando como branco água destilada. A dosagem é feita com 0,5 mL da amostra e 2,5 mL da solução trabalho de fenolfataleína. A solução trabalho é preparada pela adição de 2,0 mL de uma solução estoque de fenolfataleína 3 mM, 20 mL de uma solução de tampão carbonato 0,6 M e pH 10,5 e completando-se o volume para 100 mL com água destilada em balão volumétrico.

A curva padrão deve ser construída com no mínimo 20 pontos e a constante de equilíbrio ($K_{\beta\text{-CD}}$) deve ser estimada, utilizando os dados de absorvância em função da concentração, pelo programa Statistica[®].

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostras isoladas e imobilizadas de *Klebsiella oxytoca* foram cultivadas em meio líquido NFb malato livre de nitrogênio mineral, ao qual foi adicionado o triptofano ($100\mu\text{g.mL}^{-1}$), os isolados foram cultivadas a 28°C com agitação por um período de tempo variando de 24 às 168 h. Após cada um destes períodos os meios de cultura foram centrifugados, a seguir a 1 mL dos sobrenadantes foram adicionados 2 mL do reativo de Salkowski e depois de 25 min realizou-se a leitura em um espectrofotômetro a 530nm. O AIA foi utilizado como padrão ($10 - 100\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 1. Variação da concentração de AIA em função do tempo.

Horas	[AIA] $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por células livres	[AIA] $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por células imobilizadas
-------	--	--

24	50,2	7,1
48	51,5	32,7
72	43,8	40,8
168	55,6	92,1

Os resultados observados na Tabela 1 demonstram que as células livres apresentam uma taxa de conversão de triptofano em AIA ~ 50 % no período de 24 a 168 h, enquanto que as células imobilizadas apresentam um aumento crescente na taxa de conversão atingindo ~ 92 % no mesmo período.

A diferença apresentada na conversão deve-se ao fato de que as células imobilizadas não estão se multiplicando, convertendo assim quase todo triptofano em AIA, enquanto que as células livres utilizam parte deste aminoácido para seu crescimento.

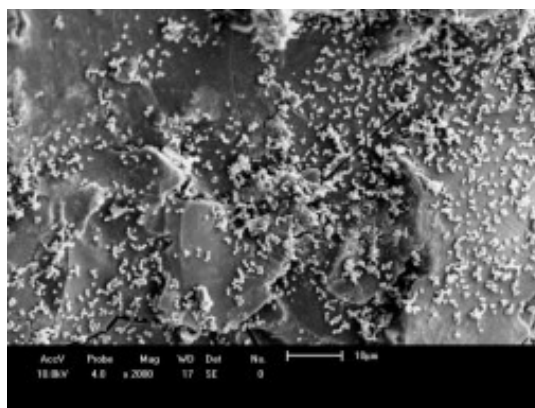
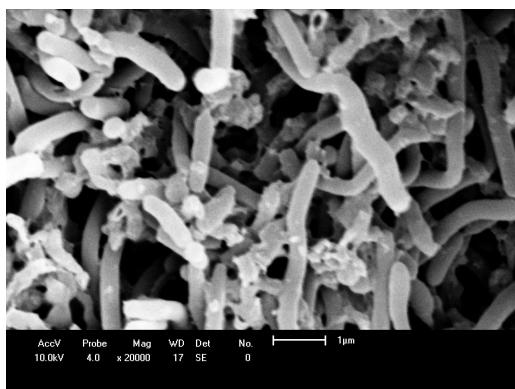


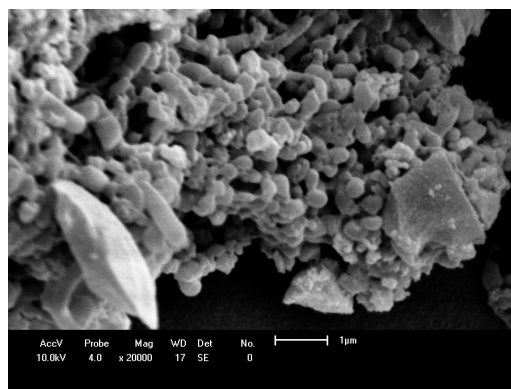
Figura 1. Micrografia da bactéria *Klebsiella oxytoca* imobilizada na matriz SiO_2/MnO

A figura 2 mostram que as micrografias observadas que tiveram uma boa adsorção da bactéria foram as matrizes $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ e $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$. Uma adsorção satisfatória na matriz $\text{V}_2\text{O}_5/\text{TiO}_2$ e uma adsorção parcial nas matrizes $\text{V}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ e celulose/ TiO_2 .

Na imobilização com $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ observou-se um aumento de 20% na produção de β -CD quando se passou de 1.2 para 3.0 g de biomassa. Já quando imobilizadas com $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$ teve uma produção de 25% maior de β -CD quando se utiliza 1.8g de biomassa.



A)



B)

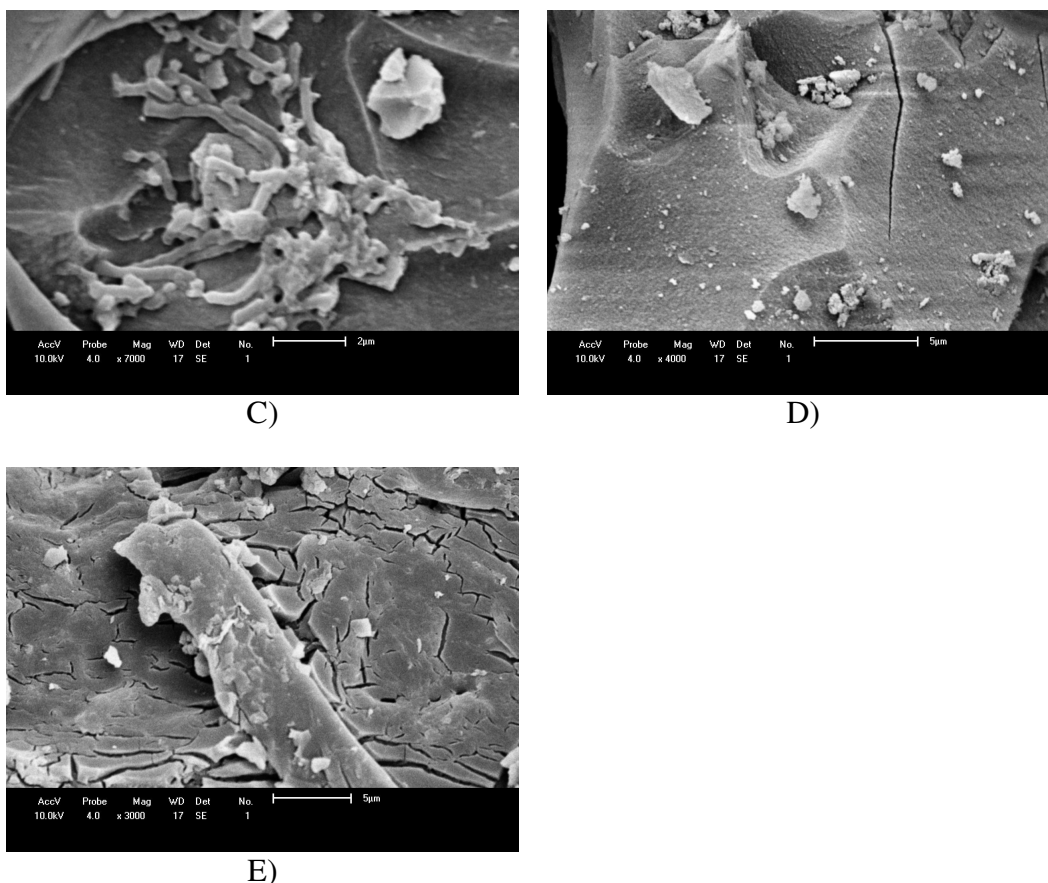


Figura 2: Célula livre (A), $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ (B), $\text{V}_2\text{O}_5/\text{TiO}_2$ (C), $\text{V}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ (D), celulose/ TiO_2 (E).

4 CONCLUSÃO

1. A *Klebsiella oxytoca* apresentou uma capacidade de fixação de nitrogênio muito similar a aos apresentados em outros trabalhos desenvolvidos com espécies deste gênero.

REFERÊNCIAS

AIROLDI, Cláudio; FARIAS, Robson Fernandes de. Alcóxidos como precursores na síntese de novos materiais através do processo sol-gel. **Química. Nova**, v. 27, n. 1, p. 84-88, 2004.

ABDEL-NABY, M.; REYARD, R. D.; ABDEL-FATTAH, A. F. Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and continuous cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 1-9, 2000.

BEYELER, M.; MICHAUX, P.; KELL, C.; HASS, D. **Effect of enhanced production of indol-3-acetic by biological control *Pseudomonas fluorescens* CHAO on plant growth**. In: Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In: Ogoshi, A.; Kobayashi, K.; Homma, Y.; Kodama, F.; Kondo, M.; Akino, S. Sapporo, Japan, October 18-22, 1997, Sapporo University, p. 310-312.

BIECKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells**, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997.

DUTOIT, D. C. M.; SCHNEIDER, M.; GÖBEL, U.; BAIKER, A. Titania-Sailica Mixed Oxides: V. Effect of Sol-Gel and Drying Conditions on Surface Properties. **J. Ca.**, v. 164, p. 433-439, 1999.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of Azospirillum and Klebsiella and their effect on rice roots. **Biol Fertil Soils**, v. 28, p. 377-381, 1999.

GONÇALVES, J. E.; GUSHIKEM, Y.; CASTRO, S. C. Preparation and properties of antimony (V) oxide adsorbed on sílica-titania mixed oxide. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 260, 25-131, 1999.

HAMON, V.; MORAES, F. F. de. **Étude préliminaire a l'immobilisation de la CGTase WACKER**. Laboratoire de Technologie Enzymatique. Université de Technologie de Compiègne. 1990. (Relatório de pesquisa)

MARSAIOLI, A. J; GONÇALVES, R. A. C; GONÇALVES, J. E; GUSHUKEM, Y. Processo de imobilização de Serratia rubidaea CCT 5732 em óxido misto de sílica-titânia. Patente Brasil, **protocolo n. 100.200-7, 2001**.

MATIOLI, G.; MORAES, F. F. de; ZANIN, F. M. **Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2000.

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira Ci. Solo**, 28:269-279, 2004.

PRIMAVESI, A. **O manejo ecológico do solo: agricultura em regiões tropicais**. 5.ed.São Paulo: Nobel, 1982, p. 172–181.

QUINTANA, M. G.; DALTON, H. Biotransformation of aromatic compounds by immobilized bacterial strains in barium alginate beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, 232-236, 1999.

TEIXEIRA, Manoel Araújo; Itamar Soares DE MELO, Itamar Soares; VIEIRA, Rosana Faria; Francisco Eduardo Carvalho COSTA; HAKAKAVA, Ricardo. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariedades em três estados brasileiros. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.1, p.43-49, jan. 2007.