



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JANAINA MANTOVAN

**MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA DE  
ALTA MASSA MOLECULAR PRODUZIDA POR *BACILLUS  
SUBTILIS* NATTO PARA POTENCIAL APLICAÇÃO  
BIOMÉDICA**

---

Londrina  
2016

JANAINA MANTOVAN

**MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA DE  
ALTA MASSA MOLECULAR PRODUZIDA POR *BACILLUS  
SUBTILIS* NATTO PARA POTENCIAL APLICAÇÃO  
BIOMÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia P.  
Colabone Celligoi

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Mantovan, Janaina.

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA DE ALTA MASSA MOLECULAR PRODUZIDA POR *Bacillus subtilis* natto PARA POTENCIAL APLICAÇÃO BIOMÉDICA / Janaina Mantovan. - Londrina, 2016.  
95 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.  
Inclui bibliografia.

1. Produção de levana - Teses. 2. Avaliação da massa molecular - Teses. 3. Acetilação - Teses. 4. Aplicação biomédica - Teses. I. Pedrine Colabone Celligoi, Maria Antonia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

JANAINA MANTOVAN

**MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA DE ALTA  
MASSA MOLECULAR PRODUZIDA POR *BACILLUS SUBTILIS*  
NATTO PARA POTENCIAL APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia Pedrine  
□ Colabone Celligoi

Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Cesar Cornelio Andrei  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Marcelo Rodrigues de Melo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 07 de Junho de 2016.

Dedico este trabalho à minha avó,  
que sempre me apoiou em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente à Deus, por permitir todas as coisas em minha vida.

À minha família e todas as pessoas especiais que acompanharam, mesmo de fora, todo o trabalho.

À minha orientadora, Maria Antonia, por permitir que eu fizesse parte de sua equipe de pesquisa, por apoiar e contribuir com minha formação, também pela paciência e amizade.

Aos professores César Andrei, Suzana Mali, Dionísio Borsato e Mario Sergio Mantovani que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Ao técnico do laboratório, Nelson, por toda paciência e dedicação em todos os dias de trabalho no laboratório.

Ao Antônio Alcaide Messias Neto, por me acompanhar em vários finais de semana e noites de trabalho nos laboratórios da UEL.

Aos meus amigos, Bruna Caroline, Dieyssi Alves, Andressa Jacqueline, Gabrielly Berssaneti, Nicole Caldas Pan e Renato, pela companhia, parceria e por compartilhar seus conhecimentos.

À todos os amigos que conheci nesse período e àqueles que me acompanham a muito tempo, mesmo com a distância.

À todos os professores do departamento, pelos ensinamentos e conselhos.

Aos funcionários Elda, Edivaldo, Sandra e Sérgio, pela atenção.

MANTOVAN, Janaina. **Modificação e Caracterização da Levana de Alta Massa Molecular Produzida por *Bacillus subtilis* natto para Potencial Aplicação Biomédica**. 2016. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina , 2016.

## RESUMO

A levana é um exopolissacarídeo (EPS) de frutose, constituído por ligações  $\beta$ -(2→6) e ramificações  $\beta$ -(2→1), sintetizada pela enzima levanasacarase (LS), nas reações de transfrutossilacção, na presença de sacarose. Pode ser produzida por diversas bactérias, das quais se destaca o *Bacillus subtilis* natto, por sua eficiência e ser reconhecido como seguro. Este EPS apresenta características importantes que permitem sua aplicação em diversas áreas da indústria, como alimentícia, farmacêutica e cosmética. Para aplicação, é importante avaliar fatores que podem interferir na produção, assim é necessário o uso de metodologias estatísticas. Outro parâmetro importante é a massa molecular, que pode interferir na aplicação do produto. Além disso, modificações na estrutura química podem aumentar a atividade biológica do polissacarídeo para aplicação na área da saúde. Este trabalho teve como objetivo produzir e avaliar a massa molecular da levana de *B. subtilis* natto em Erlenmeyer, utilizando planejamento fatorial com análise por superfície de resposta e aplicar a melhor condição em biorreator. A levana obtida na melhor condição em Erlenmeyer (185 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH 6,5) foi de 17,17 g.L<sup>-1</sup>, com 44,81% de massa molecular de  $\geq$  670 kDa. Nas fermentações em biorreator a maior produção foi de 19,3 g.L<sup>-1</sup> em B3 (185 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, sem controle de pH, aeração 2 v.v<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) e a maior massa molecular (78,5%  $\geq$  670 kDa) foi encontrada após 6 h em B2 (185 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, sem controle de pH, aeração 0,5 v.v<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>). A levana obtida em B2 6h foi submetida ao processo de acetilação, e avaliada quanto ao seu potencial como agente antioxidante e antitumoral. A reação de modificação gerou levana em dois graus de acetilação L<sub>ac1</sub> (47,3%) e L<sub>ac2</sub> (5,5%). As estruturas da levana nativa e modificada foram confirmadas através RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e FT-IR (Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier). L<sub>ac1</sub> e L<sub>ac2</sub> exibiram maior capacidade de eliminação do radical DPPH, enquanto a levana nativa exibiu atividade inibitória contra células de hepatoma humano (HepG2), mostrando assim, que a levana nativa e seus derivados acetilados possuem potencial aplicação na área da saúde, como possíveis agentes antitumoral e antioxidante.

**Palavras-chave:** Levana. Massa Molecular. Acetilação. Antioxidante. Antitumoral.

MANTOVAN, Janaina. **Modification and Characterization of High Molecular Weight Levan Produced by *Bacillus subtilis* natto for Potential Biomedical Application.** 2016. 95p. Dissertation (Master's on Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Levan is a fructose exopolysaccharide (EPS) consisting of  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6) bonds and  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) branches, synthesized by levansucrase enzyme, by transfructosylation reactions in the presence of sucrose. It can be produced by various bacteria, which stands *Bacillus subtilis* natto, because of its efficiency and be recognized as safe. This EPS has important features that allow its application in various areas of industry, such as food, pharmaceutical and cosmetics industries. For application, it is important to assess factors that can interfere with the production, so the use of statistical methods is required. Another important parameter is the molecular weight, which can interfere with the application of the product. In addition, changes in the chemical structure can increase the biological activity of polysaccharide for use in health care. This study aimed to produce and evaluate levan molecular weight of *B. subtilis* natto in Erlenmeyer, using factorial design with analysis of response surface and apply the best condition in the bioreactor. The levan obtained in the best condition in flasks (185 g.L<sup>-1</sup> sucrose and pH 6.5) was 17,17 g.L<sup>-1</sup>, with 44.81% of molecular mass of  $\geq$  670 kDa. In the bioreactor fermentations the highest yield was 19.3 g.L<sup>-1</sup> in B3 (185 g.L<sup>-1</sup> sucrose without control of pH, aeration v.v<sup>-1</sup> 2-1.min<sup>-1</sup>) and higher molecular weight (78.5%  $\geq$  670 kDa) was found after 6 h in B2 (185 g.L<sup>-1</sup> sucrose without control of pH, aeration 0.5 v.v<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>). The levan obtained 6h B2 was subjected to the acetylation process, and evaluated for their potential antitumor agent and as an antioxidant. The modification reaction levan generated in two degrees of acetylation L<sub>ac1</sub> (47.3%) and L<sub>ac2</sub> (5.5%). The structures of native and modified levan were confirmed by NMR (Nuclear Magnetic Resonance) and FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). L<sub>ac1</sub> and L<sub>ac2</sub> exhibited higher scavenging capacity of DPPH radical, while the native levan exhibited inhibitory activity against human hepatoma cells (HepG2), thus showing that the native levan and their acetylated derivatives have potential application in health care, as possible agents antitumor and antioxidant.

**Keywords:** Levan. Molecular Weight. Acetylation. Antioxidant. Antitumor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> –	Representação esquemática para síntese de levana .....	16
<b>Figura 2</b> –	Reações para formação de levana e fruto-oligossacarídeos .....	17
<b>Figura 3</b> –	Estrutura química de molécula de levana formada por ligações $\beta$ -(2→6) na cadeia principal e ligações $\beta$ -(2→1) nas ramificações .....	18
<b>Artigo 1</b>		
<b>Figura 1</b> –	Formação de levana e FOSs: a sacarose funciona como doador e acceptor de grupos frutossil, gerando fruto-oligossacarídeos, através da ação da LS. A levana pode ser formada pelo alongamento da 6-Cestose (enzima ataca O <sup>6</sup> da sacarose). .....	44
<b>Figura 2</b> –	Análise do perfil cromatográfico (A1) e produção (A2) do EPS produzido por <i>B. subtilis</i> em meio contendo 150 g.L <sup>-1</sup> , pH 6,5 e recuperado a partir de diferentes proporções de etanol (75, 150 e 300%) .....	49
<b>Figura 3</b> –	Superfície de resposta da produção de levana de <i>B. subtilis natto</i> relacionando pH e sacarose.....	52
<b>Figura 4</b> –	Perfil cromatográfico (A1), avaliação da massa molecular, produção de levana por <i>B. subtilis</i> e pH (A2) em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 h) através das fermentações em biorreator nas diferentes condições (B1, B2 e B3).....	54
<b>Figura 5</b> –	Avaliação da atividade enzimática (A1), produtividade de levana (A2), biomassa (A3) e consumo de açúcar (A4) das fermentações realizadas em biorreator (B1, B2 e B3).....	56
<b>Figura 6</b> –	Espectros de RMN <sup>1</sup> H de levana (D <sub>2</sub> O), L <sub>ac1</sub> (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) e L <sub>ac2</sub> (D <sub>2</sub> O) .....	58
<b>Figura 7</b> –	Espectros de FT-IR (4000 a 400 cm <sup>-1</sup> ) de levana, L <sub>ac1</sub> e L <sub>ac2</sub> .....	59
<b>Figura 8</b> –	Taxa de inibição (%) dos radicais livres DPPH de levana, L <sub>ac1</sub> e L <sub>ac2</sub> . (A) e Efeito Citotóxico de levana e L <sub>ac2</sub> sobre células HepG2/C3a (B) .....	60

## **Resultados complementares: Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca e levana de alta massa molecular**

<b>Figura 13</b> – Micrografias dos filmes de Amido e Amido+Levana (Amido + L10, 20 e 30%).....	71
<b>Figura 14</b> – AFM dos filmes de Amido (A) e Amido + Levana 10% (B), 20 (C) e 30% (D) .....	72
<b>Figura 15</b> – Análises de FT-IR das amostras de amido nativo (Am.nat) e levana nativa (L.nat) e filmes (Am+L10, 20 e 30%).....	73
<b>Figura 16</b> – Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) da levana nativa (L.nat) e filmes de amido (Am) e amido+levana (Am+L10, 20 e 30%).....	74
<b>Figura 17</b> – Padrões de difração de raios X do amido nativo (Am.nat), levana nativa (L.nat), filme de amido (Am) e filmes de amido/levana (Am+L 10, 20 e 30%).....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Deslocamentos químicos (ppm) de $^{13}\text{C}$ RMN de levanas produzidas por diferentes microrganismos.....	19
<b>Tabela 2</b> – Polissacarídeos modificados de diversas origens com atividade biológica na área da saúde. ....	26
<b>Tabela 3</b> – Aplicações industriais da levana. ....	28
<b>Tabela 4</b> – Delineamento composto central rotacional $2^2$ para avaliar a influência das variáveis independentes: (X1) concentrações de sacarose, (X2) pH na produção de levana de <i>B. subtilis</i> natto. As fermentações foram realizadas por 24 h, a 37° C e 160 rpm.....	34
<b>Tabela 5</b> – Produção de levana, LS, consumo de açúcares e biomassa por <i>B. subtilis</i> natto variando sacarose e pH (DCCR $2^2$ ) .....	50
 <b>Artigo 1</b>	
<b>Tabela 1</b> - Produção de levana, LS, consumo de açúcares e biomassa por <i>B. subtilis</i> natto variando sacarose e pH (DCCR 22) .....	50
<b>Tabela 2</b> – Análise de variância (ANOVA) para produção de LEVANA de <i>B. subtilis</i> natto.....	51
 <b>Resultados complementares: Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca e levana de alta massa molecular</b>	
<b>Tabela 7</b> – Espessura, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos com amido (Am) e amido/levana (Am+L 10, 20 e 30%).....	76
<b>Tabela 8</b> – Propriedade mecânicas dos filmes de amido (Am) e amido/levana (Am+L 10, 20 e 30%).....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
CAZY	Base de dados das enzimas com atividade em carboidratos
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DS	Degree of Substitution
EPS	Exopolissacarídeo
FOS	Fruto-oligossacarídeos
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
g	Força g ou Força Centrífuga Relativa
GP	Grau de polimerização
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
GRAS	General Recognized As Safe
HepG2-C3A	Linhagem de carcinoma hepatocelular humano
HMWL	Levana de alta massa molecular
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
L <sub>ac1</sub>	Levana acetilada 1
L <sub>ac2</sub>	Levana acetilada 2
LMWL	Levana de baixa massa molecular
L <sub>nat</sub>	Levana nativa
LS	Levanasacarase
MSR	Metodologia de superfície de resposta
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
MW	Massa molecular
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
Sac	Sacarose
UA	Unidade de atividade enzimática
vvm	Volume de gás por unidade de volume de líquido por minuto

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos.....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1	Levana: síntese, estrutura e propriedades .....	15
3.2	Produção de Levana.....	20
3.2.1	Avaliação da Massa Molecular.....	22
3.3	Modificações na Estrutura Química de Polissacarídeos .....	25
3.4	Aplicações da Levana .....	28
3.4.1	Aplicações na Área Biomédica.....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1	Microrganismo.....	33
4.2	Inóculo .....	33
4.3	Meios e Condições de Cultivo .....	33
4.3.1	Fermentações em Erlenmeyer.....	34
4.3.2	Fermentações em Biorreator .....	34
4.4	Determinações Bioquímicas e Analíticas .....	35
4.4.1	Quantificação da Biomassa.....	35
4.4.2	Dosagem dos Açúcares Totais (AT).....	35
4.4.3	Separação e Purificação da Levana.....	35
4.4.4	Quantificação de Levana.....	36
4.4.5	Atividade Enzimática.....	36
4.4.6	Estimativa da Massa Molecular da Levana .....	36
4.5	Modificação da Levana por Acetilação .....	37
4.6	Caracterização da levana por RMN e FT-IR .....	37
4.7	Potencial Biomédico da Levana Nativa e Modificada.....	38
4.7.1	Atividade Antioxidante.....	38
4.7.2	Avaliação dos Efeitos Cytotóxicos .....	38

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
5.1	Artigo 1 .....	41
5.2	Resultados complementares: Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca e levana de alta massa molecular.....	67
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	76
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	78
	<b>ANEXO</b> .....	85
Anexo A -	Normas para a submissão do artigo para o periódico Carbohydrate Polymers .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos extracelulares (EPS) compõem uma ampla diversidade de moléculas, que podem ser produzidas por bactérias, fungos e plantas e apresentam diversas aplicações industriais. A levana é um EPS constituído predominantemente por resíduos de D-frutose, unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6), podendo ainda apresentar pontos de ramificações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1). É sintetizada pela LS, uma enzima extracelular, através da reação de transfrutossilacção.

A levana pode ser produzida por diversas famílias de bactérias, mas estudos demonstraram que *B. subtilis* natto é um dos microrganismos mais eficientes na produção de levana. O género *Bacillus* apresenta-se como um grupo de bactérias Gram-positivas, de respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa. É considerado seguro para saúde (GRAS). A cepa de *B. subtilis* natto é utilizada no preparo de soja fermentada, um alimento tradicional no Japão, conhecido por natto apresenta potencial de produzir levana.

Devido às suas propriedades, tais como viscosidade, solubilidade em água e óleo, compatibilidade com sais e surfactantes, estabilidade ao calor, a ácidos e a bases pode atuar como agente estabilizador, emulsificante, espessante, encapsulante e osmorregulador. Tais características permitem sua aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Pode agir como prebiótico, auxiliando a microflora intestinal. Além disso, estudos mais recentes, tem mostrado o potencial da levana na área da saúde, em estudos *in vitro* e *in vivo*, como ação antiviral, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante, imunomodulatória, antioxidante e antitumoral.

Para que o EPS possa ser utilizado em aplicações industriais é preciso estabelecer processos viáveis de produção em maior escala. Para isto, muitos fatores importantes devem ser ajustados previamente, como pH, temperatura, concentração de sacarose, agitação e adição de sais, sendo necessária à utilização de metodologias estatísticas, que permitem identificar e quantificar diferentes interações entre os diferentes parâmetros e ainda reduzir o número de experimentos. A metodologia de planejamento fatorial associada à análise por superfície de resposta (MSR) tem sido amplamente aplicada em processos fermentativos para obtenção de produtos de interesse industrial.

Assim como produção e atividade enzimática, a massa molecular é outro fator que deve ser analisado, já que pode estar relacionado com a atividade

biológica do polissacarídeo obtido. A massa molecular da levana, produzida por síntese enzimática ou microbiana, pode variar de acordo com o microrganismo produtor e as condições de cultivo, sendo que pH e sacarose são algumas das variáveis mais influentes. O *Bacillus subtilis* pode produzir, de acordo com o grau de polimerização, fruto-oligossacarídeos e levanas, que apresentam maior massa molecular. Essas são descritas na literatura em uma ampla faixa, variando entre 4 e 7.080 kDa. Na área da saúde é relatado o uso de levanas com alta e baixa massa molecular.

As modificações na estrutura química da levana podem interferir, geralmente de forma positiva, na atividade biológica. As modificações em EPSs descritas na literatura, acetilação, fosforilação, sulfatação e carboximetilação, têm mostrado efeitos biológicos importantes. Durante estes processos, além da introdução dos novos grupos químicos, podem ocorrer mudanças estruturais, conformacionais, expansões na cadeia e diminuição do teor de proteínas e da massa molecular. A levana modificada, através de diferentes processos pode apresentar maior capacidade antioxidante e antitumoral.

Assim, este estudo teve como objetivo produzir e avaliar a massa molecular da levana em diferentes condições de cultivo, promover modificações químicas na molécula e avaliar o potencial biomédico de aplicação da levana nativa e modificada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 . Objetivo Geral**

Produzir, modificar e caracterizar a levana de *Bacillus subtilis* natto para avaliar sua aplicação biomédica.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Avaliar processos de separação de levana de diferentes massas moleculares;

Avaliar a produção da levana de *B. subtilis* variando as concentrações de sacarose e pH, através de planejamento fatorial;

Produzir levana em biorreator na melhor condição obtida em batelada e caracterizar quanto a massa molecular;

Modificar a levana produzida, através do processo de acetilação;

Avaliar a capacidade antioxidante da levana nativa e acetilada;

Avaliar o potencial citotóxico das levanas nativa e modificada em células tumorais de hepatoma humano.

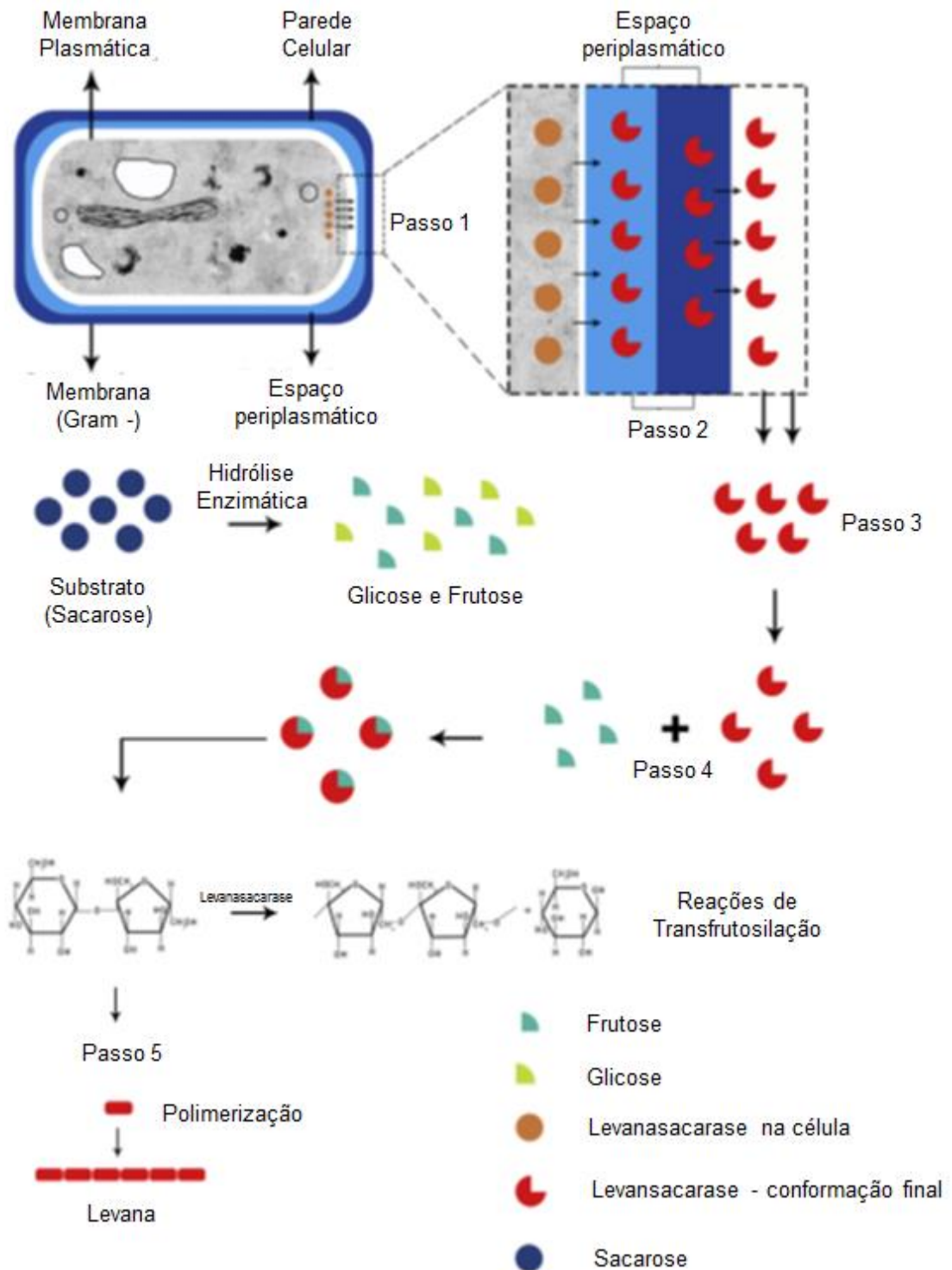
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Levana: síntese, estrutura e propriedades

Um grande número de polissacarídeos bacterianos foi relatado nas últimas décadas, e sua composição, estrutura, biossíntese e propriedades funcionais têm sido amplamente estudadas. Os polissacarídeos microbianos podem ser classificados de acordo com a sua localização e função na célula: (a) citosólicos, funcionam como fonte de carbono e energia, (b) componentes de parede celular, como peptidoglicanos, ácido teicóico e lipopolissacarídeos e (c) exopolissacarídeos, que compreendem polissacarídeos excretados para o meio extracelular (DONOT et al., 2012). A maior parte dos EPSs é sintetizada intracelularmente e exportada para o meio extracelular, na forma de cápsulas ou biofilme. Existem algumas exceções conhecidas, como a levana e dextrana, cuja síntese e polimerização ocorrem fora das células, através de enzimas que convertem o substrato para o polímero no ambiente extracelular (FREITAS; ALVES; REIS, 2011).

A levana é sintetizada pela levanasacarase (LS) (sacarose: 2,6- $\beta$ -D-frutana-2,6- $\beta$ -D-frutossiltransferase, E.C.2.4.1.10), uma enzima extracelular classificada como glicosil hidrolase 68 (GH 68), um grupo de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato, segundo a base de dados das enzimas com atividade em carboidratos (CAZY). A Figura 1 mostra a representação esquemática e resumida da formação da levana. Primeiramente, ocorre a biossíntese da enzima na célula (Passo 1), que pode ser de forma constitutiva e indutiva no *B. subtilis* (ABDEL-FATTAH; MAHMOUD; ESAWY, 2005), através da ativação do gene *sacB* (ANANTHALAKSHMY, V.; GUNASEKARAN, P., 1999). A enzima adquire a conformação final no espaço periplasmático (Passo 2) e então é excretada para o meio extracelular (Passo 3). Este processo pode ser feito pela clivagem do peptídeo sinal, seguido pelo dobramento de proteínas ou por um mecanismo iniciado através de um peptídeo sinal, em uma via própria. A LS atua sobre as moléculas doadoras (substratos) e a síntese de levana é iniciada, através das reações de transfrutosilação (Passo 4). E por fim (Passo 5), a enzima continua adicionando as unidades de frutose à cadeia da levana (SRIKANTH et al., 2015a).

**Figura 1** – Representação esquemática para síntese de levana.

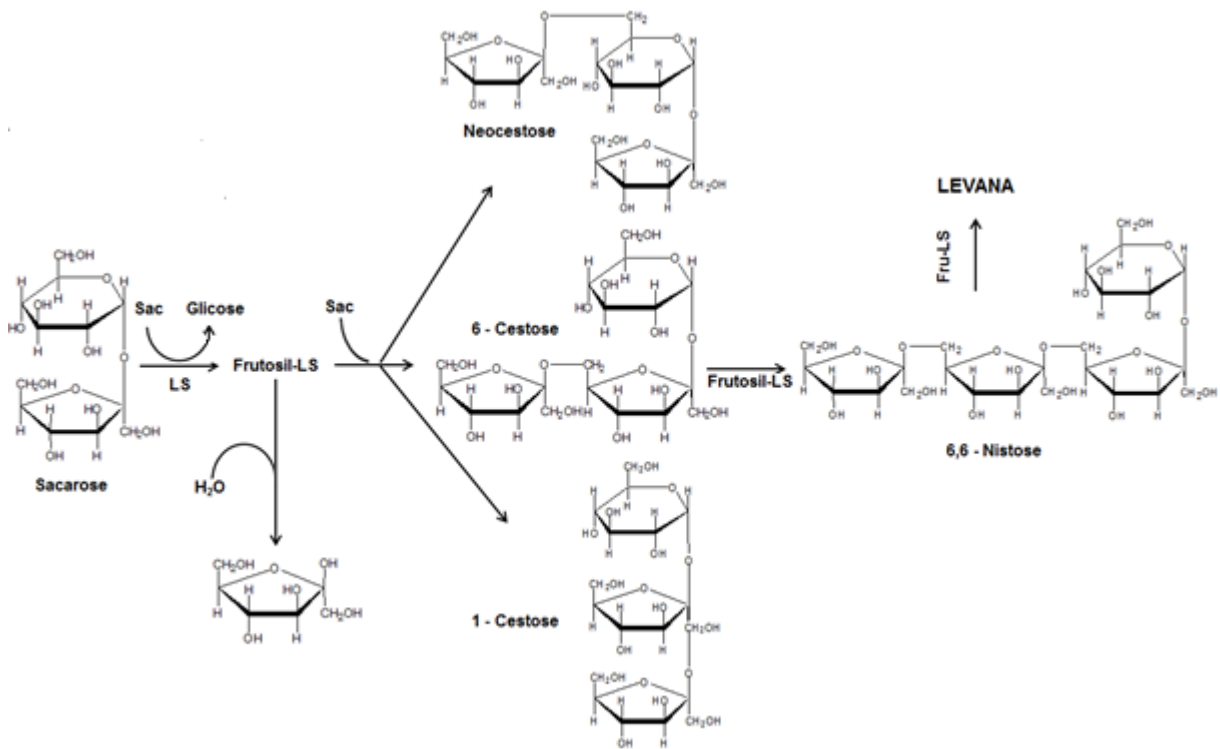


**Fonte:** Srikanth et al. (2015a), modificado.

A reação de transfrutossilacção (Figura 1 – Passo 4) é apresentada com mais detalhes na Figura 2. Na presença de sacarose (Sac), a LS (LS) inicia sua ação com a formação de um intermediário frutossil-enzima (Frutossil-LS) e pode transferir o

resíduo de frutose para água (reação de hidrólise) ou para outra molécula receptora presente no meio de reação (reação de aceptor), sendo que estas moléculas podem funcionar como substrato e produto da reação, em um mecanismo chamado ping-pong (CHAMBERT; TREBOUL; DEDONDER, 1974). Quando a sacarose funciona como aceptor, três trissacarídeos principais são formados, 1-Cestose, Neocestose e 6-Cestose, que podem funcionar como base para o alongamento da cadeia. A partir da 1-Cestose (enzima ataca o O<sup>1</sup> da sacarose) pode ser formada a Nistose, e a 6-Cestose (enzima ataca o O<sup>6</sup> da sacarose) funciona como base para formação da levana, quando mais unidades de frutose (Frutosil-LS) são adicionadas à cadeia através da LS (SANTOS-MORIANO et al., 2015).

**Figura 2** –Reações para formação de levana e fruto-oligossacarídeos.

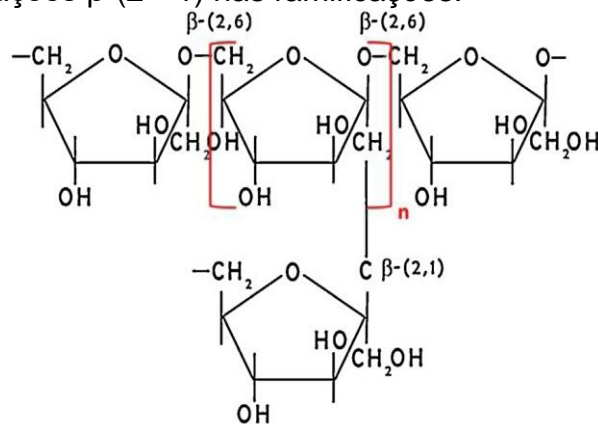


**Fonte:** o próprio autor.

A levana foi identificada pela primeira vez pelos pesquisadores Greig - Smith em 1901 através de observações de soluções contendo sacarose, como caldo-de-cana, onde um microrganismo do gênero *Bacillus* produzia uma goma, deixando o meio viscoso. Esta goma recebeu o nome de levana, por desviar o plano da luz polarizada para a esquerda, em analogia a dextrana, uma goma já conhecida na época. Simms; Boyko; Edwards (1990), utilizando análises de oxidação por periodato,

metilação, clivagem-redutiva, e posterior análise por cromatografia gasosa, espectroscopia de massa e ressonância magnética nuclear de  $C^{13}$ , determinaram que a estrutura da levana é constituída por uma cadeia principal de resíduos  $\beta$ -D-frutofuranosídicos, unidos por ligações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6) em aproximadamente 70% do polissacarídeo, e ramificações com ligações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) em torno de 30% (Figura 3), provavelmente o polímero de levana possui uma estrutura dendrítica, produzindo uma macromolécula de forma globular.

**Figura 3** – Estrutura química de molécula de levana formada por ligações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6) na cadeia principal e ligações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) nas ramificações.



**Fonte:** Srikanth et al. (2015a).

Dahech et al. (2013) caracterizaram a estrutura química da levana produzida por *Bacillus licheniformis* utilizando FT-IR (Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier) e RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Para as análises em FT-IR, os espectros revelaram uma banda forte a  $3300\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração de alongamento do grupo hidroxil; outra banda em  $3000\text{ cm}^{-1}$ , devido à vibração de alongamento da ligação C-H; banda larga a  $1600\text{ cm}^{-1}$ , devido à ligação com água; uma absorção forte a  $1000\text{ cm}^{-1}$  relacionada com ligação glicosídica (C-O-C) e ainda uma absorção característica a  $900\text{ cm}^{-1}$  e  $800\text{ cm}^{-1}$  indicando a presença de anéis furanosídicos das unidades de açúcar. As análises de  $^1\text{H}$  RMN mostram, principalmente a presença dos hidrogênios glicosídicos na região entre 3,4 e 4,3 ppm, referentes às unidades de frutose provenientes da levana (ESAWY et al., 2013b). A Tabela 1 mostra alguns resultados obtidos por análise de  $^{13}\text{C}$  RMN a partir de diferentes microrganismos, incluindo o *B. subtilis* natto.

**Tabela 1** - Deslocamentos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$  RMN de levanas produzidas por diferentes microrganismos.

Átomo Carbono	Deslocamento Químico (ppm)			
	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. subtilis</i> Natto	<i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293
C-1	59.78	60.7	60.1	60.03
C-2	104.176	104.2	104.4	104.34
C-3	76.179	77.0	76.5	76.44
C-4	75.120	75.7	75.4	75.34
C-5	80.257	80.5	80.5	80.44
C-6	63.35	63.6	63.6	63.54

**Fonte:** Dahech et al.(2013).

A levana possui algumas características importantes que a tornam de grande utilidade para diversas aplicações. Entre as propriedades reológicas, estão a solubilidade em água, baixa viscosidade intrínseca ( $\eta = 0,17 \text{ dL g}^{-1}$ ) e alta força de tensão, 991 psi, tornando-a um polímero muito compacto, que pode conferir ao microrganismo algumas vantagens como agregação celular, tolerância ao estresse osmótico e dessecação (KASAPIS et al., 1994). Arvidson; Rinehart; Gadala-Maria (2006) encontraram valor semelhante para levana produzida por *Bacillus* sp. ( $\eta = 0,14 \text{ dL g}^{-1}$ ). No estudo de Bae et al. (2008), a levana produzida por *Microbacterium laevaniformans* apresentou viscosidade intrínseca  $\eta = 0,38 \text{ dL g}^{-1}$ , esses resultados indicam que tais propriedades podem variar de acordo com o microrganismo produtor e condições de cultivo, refletindo nas aplicações. Apresenta também compatibilidade com sais e surfactantes, estabilidade ao calor, a ácidos e a bases, capacidade de formação de filme, de retenção de água e de produtos químicos (BEKERS et al., 2005).

A levana pode ser produzida por diversas famílias de bactérias como *Pseudomonas ssp.*, *Acetobacter pasteurianus*, *Aerobacter levanicum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, entre outros (GHALY et al., 2007). O gênero *Bacillus* apresenta-se como um grupo de bactérias gram-positivas, com forma de bastonetes. São organismos de respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa. A maioria das espécies é mesofílica, porém podem ser psicrófilas e termófilas (BARROS, 2004). A cepa de *B. subtilis* natto é utilizada no preparo de soja fermentada, um alimento tradicional no Japão, conhecido por natto (HO et al., 2006). Para os microrganismos, a levana provavelmente funciona como fonte de armazenamento de carboidratos, quando as fontes de carboidratos intracelulares e extracelulares tornam-se baixas (MIASNIKOV, 1997; YUN, 1996).

Estudos demonstraram que *B. subtilis natto* é um dos microrganismos mais eficientes na produção de levana (SHIH et al., 2005; WU; CHOU; SHIH, 2013; MELO et al., 2015).

### 3.2. Produção de Levana

A levana pode ser produzida tanto por síntese enzimática, quanto microbiana (GONÇALVES et al., 2013). A síntese microbiana, para produção de levana e LS, através de fermentação submersa é o método mais utilizado (SHIH et al., 2011; ESAWY et al., 2013b; SILBIR et al., 2014). O sucesso do processo fermentativo depende de muitos fatores importantes, como pH, tempo e concentração de sacarose no meio de cultivo, sendo assim as ferramentas estatísticas se tornam importantes em processos biotecnológicos. A metodologia de superfície de resposta (MSR), uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas para o desenvolvimento e otimização de processos, pode ser empregada para identificar e quantificar diferentes interações entre os diferentes parâmetros. A MSR tem sido amplamente utilizada para otimizar as condições dos meios de cultivo e outros parâmetros em bioprocessos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007; GÖKSUNGUR; UZUNOĞULLARIA; DAĞBAĞLIB, 2011; KAN et al., 2015).

No estudo de Esawy et al. (2013a) o uso de planejamento estatístico permitiu a avaliação de quinze diferentes fatores, que podem afetar a produção da LS, em um número relativamente baixo de ensaios. Inicialmente, foi realizada uma pré-seleção das variáveis mais importantes utilizando a técnica de Plackett-Burman, e em uma segunda etapa foi utilizado um planejamento fatorial fracionário com análise por superfície de resposta, a fim de otimizar as variáveis que apresentaram efeito positivo significativo para produção da enzima. A maior produtividade enzimática, 170 U/g, foi encontrada na presença de glucose, extrato de levedura e pH 8.

Berté et al. (2013) avaliaram a produção de LS e levana por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, através de dois planejamentos fatoriais sucessivos. Primeiramente, para otimizar a concentração de sacarose, pH, tempo de fermentação e agitação, foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^4$ . Com base nos resultados obtidos, foi empregado um planejamento fatorial fracionado  $3^{3-1}$ , onde foram avaliados a concentração de sacarose, pH e agitação. Os resultados, analisados por MSR, mostraram que a concentração de sacarose, pH e agitação foram significativas, e a condição ótima foi 300 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 6,0, 180 rpm de

agitação em 24 h, onde a atividade da enzima foi de 6,57 UA (unidade de atividade enzimática) e produção de levana foi 10,32 g.L<sup>-1</sup>. A maior produção de levana foi de 30,09 g.L<sup>-1</sup> e ocorreu no meio contendo 300 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 5,0, 160 rpm de agitação, em 24 h, e a atividade enzimática foi 3,54 UA, indicando que as condições ótimas para produção do polissacarídeo e da enzima podem ser diferentes.

Oliveira et al. (2007) estudaram a produção de levana por *Z. mobilis* ATCC 31821 empregando três planejamentos fatoriais. Inicialmente foi utilizado um planejamento fatorial completo 3<sup>2</sup> para otimizar a concentração de açúcar (150, 250 e 350 g.L<sup>-1</sup>) e o tempo de fermentação (12; 18 e 24 h). Um segundo planejamento 2<sup>4-1</sup> para avaliar os efeitos dos constituintes do meio de cultivo (g.L<sup>-1</sup>): extrato de levedura (0, 1 e 2), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0; 1 e 2); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0; 0,5 e 1) MgSO<sub>4</sub> (0; 0,25 e 0,5) e um terceiro planejamento 2<sup>5</sup> para estudar a influência do melaço e caldo de cana-de-açúcar. Foi definido o tempo de fermentação de 24 h e concentração de açúcares de 250 g.L<sup>-1</sup>. Pelos resultados houve um decréscimo da produção de levana em melaço (2,53 g.L<sup>-1</sup>), quando comparado ao meio de sacarose comercial (21,68 g.L<sup>-1</sup>) e caldo de cana (15,45 g.L<sup>-1</sup>). Extrato de levedura e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foram significativos no meio contendo sacarose comercial, assim como, o extrato de levedura e MgSO<sub>4</sub> foram significativos no meio contendo caldo.

Após uma pré-seleção dos fatores mais importantes para produção de levana de *Pseudomonas fluorescens*, através do delineamento Plackett-Burman, Jathore et al. (2012) escolheram as variáveis, sacarose, NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub> e peptona de caseína, para aplicar em um delineamento composto central. A melhor condição foi encontrada em meio contendo (g.L<sup>-1</sup>): sacarose, 60; NH<sub>4</sub>Cl, 1,5; NaNO<sub>3</sub>, 2,0; e peptona de caseína, 15,0. O pH foi fixado em 6,0. A taxa de levana aumentou, consideravelmente, de 5,27 para 15,42 g.L<sup>-1</sup>.

Após os processos de otimização, geralmente realizados em Erlenmeyer, a produção de levana pode ser aplicada a uma segunda etapa, em reatores. Para otimizar a produção de levana de *Z. mobilis* B-14023 em uma fermentação em batelada, um planejamento fatorial 3<sup>3</sup>, foi utilizado, variando a concentração inicial de açúcar, tempo e pH. A maior produção de levana (40,20 g.L<sup>-1</sup>) foi obtida em 299,10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 6,0, em 42,30 h. Esta condição foi então empregada em uma fermentação contínua em reator de coluna, utilizando células imobilizadas em Ca-alginato. Duas taxas de diluição no reator foram determinadas: D

= 0,22 h<sup>-1</sup>, em que a produtividade de levana teve seu maior valor (6,56 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e na taxa D = 0,14 h<sup>-1</sup> foi de 31,8 g.L<sup>-1</sup> (SILBIR et al., 2014).

No estudo de Esawy et al. (2013b), a produção de levana foi avaliada em Erlenmeyer e biorreator, com e sem controle de pH e aeração em 0,5 v.v<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. As condições para as fermentações foram (sacarose, 100 g.L<sup>-1</sup> e pH 7,0). Em Erlenmeyer as produções de levana e biomassa foram de 18,60 g.L<sup>-1</sup> e 0,90 g.L<sup>-1</sup>, após 15 e 9 h, respectivamente. Em biorreator, sem controle de pH, a produção foi de 4,3 g.L<sup>-1</sup> após 5 h a produção aumentou para 36,8 g.L<sup>-1</sup> e a biomassa para 1,60 g.L<sup>-1</sup>, após 10 h. A fermentação com controle de pH apresentou os melhores resultados onde a produção de levana atingiu 59,40 g.L<sup>-1</sup>, a biomassa 2,34 g.L<sup>-1</sup> e atividade de LS aumentou. Esse aumento foi atribuído, principalmente, ao aumento da aeração e agitação.

### 3.2.1. Avaliação da Massa Molecular

A massa molecular do polissacarídeo obtido é um parâmetro importante, que junto com a produção e atividade enzimática, pode influenciar na aplicação. Levanas de alta e baixa massa molecular têm sido relatadas por apresentarem efeitos positivos na área da saúde (CALAZANS et al., 2000; ESAWY et al., 2013b). A massa molecular e o grau de ramificação da levana podem variar de acordo com o microrganismo produtor e as condições de cultivo. São encontradas massas moleculares em uma ampla faixa, variando de 4 kDa e 7080 kDa (ZHANG et al., 2013; PAUL et al., 2011).

Segundo Li; Seo; Karboune et al. (2015), a partir das reações de transfrutossilacção, três produtos podem ser gerados, fruto-oligosacarídeos (FOS), oligolevanas e levanas, que possuem grau de polimerização (GP) de  $2 < GP \leq 10$ ,  $10 < GP \leq 30$  e  $GP \geq 30$ , respectivamente. Wu; Chou; Shih. (2013) relatam que valores elevados para pH e sacarose favorecem EPSs de menor massa molecular, enquanto valores menores resultam em EPSs de maior massa molecular. Outro parâmetro que interfere na massa é o tempo de fermentação, Shih et al. (2005) encontraram levana de maior massa molecular em 7 h, e a massa decaiu ao longo da fermentação.

A levana é produzida como uma mistura com diferentes massas e o processo de separação da levana do meio de fermentação, pode selecionar massas moleculares diferentes, com as diferentes proporções de solventes utilizados na precipitação. Porras-Domínguez et al. (2015) descreveram que a proporção 1:1,5

(meio fermentado:etanol) na separação da levana do meio de cultivo, resulta na obtenção de EPSs de maiores massas moleculares já em proporções mais elevadas de etanol os EPSs precipitados apresentam menor massa molecular.

A atividade enzimática de LS para hidrólise da sacarose ou síntese de FOS e levana de *Z. mobilis* foi avaliada variando concentrações de sacarose e temperatura. A formação de levana atingiu o valor mais elevado a 4 °C e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O aumento de temperatura (40 °C) e a concentração de sacarose (600 g.L<sup>-1</sup>) causaram uma redução significativa da concentração de levana e uma maior produção de FOS. Entre os tipos de FOS formados estavam FOS do tipo inulina (1-cestose, nistose, <sup>1</sup>F-frutosilevanaistose), neoFOS e FOS do tipo levana (6-cestose, 6,6-nistose) (SANTOS-MORIANO et al, 2015). Raga-Carbajal et al. (2015) estudaram a síntese enzimática de levana e FOS de *Bacillus subtilis* e concluíram que a formação de levana e/ou FOS é regulada apenas pela quantidade de enzima, e não pela concentração de sacarose, sendo que em altas concentrações de enzima predomina a síntese de FOS e em baixas concentrações predomina a formação de levana.

Abdel-Fattah, Mahmoud; Esawy (2005) estudaram a síntese enzimática de levana e frutoligossacarídeos, a partir da LS parcialmente purificada de *Bacillus subtilis* NRC 33a em meio contendo sacarose. A concentração da enzima na mistura de reação, que variou de 5 a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, influenciou pouco na massa molecular da levana, mas aumentou a conversão de frutose em levana. A concentração de sacarose interferiu em ambos. Quando 5% de sacarose foram adicionados na mistura de reação, obtiveram-se massas moleculares mais altas, mas em concentrações acima, esta diminuiu em até 40%. As variações de temperatura também influenciaram, sendo a maior massa molecular (58,52 kDa) na temperatura de 15 °C e gradualmente decresceu em temperaturas mais altas.

Paul et al. (2011) estudaram o efeito de diferentes sais metálicos na atividade hidrolítica de LS de *Acetobacter nitrogenifigens* RG1<sup>T</sup>, como o NaCl; CaCl<sub>2</sub>; FeCl<sub>2</sub>; FeCl<sub>3</sub>; CuSO<sub>4</sub>; NiCl<sub>2</sub>; ZnCl<sub>2</sub>; MgCl<sub>2</sub>; CdCl<sub>2</sub>; e HgCl<sub>2</sub>. O HgCl<sub>2</sub> foi o único sal que se mostrou positivo, com 133% no aumento da atividade em relação ao controle, aumentando a atividade de polimerização da enzima de 5 a 7 vezes. Este sal foi capaz de estabilizar a enzima, e a levana produzida apresentou uma massa molecular de 7080 kDa.

Para obter as condições ótimas para biossíntese de levana pela LS, Zhang et al. (2013) testaram entre outros fatores, a presença de diferentes íons

metálicos, como  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ , e  $K^+$ . A LS foi incubada nesses sais na concentração de 20 mM. O  $Mg^{2+}$  promoveu aumento em cerca de 15% na síntese de levana em comparação com o controle. A levana produzida apresentou massa molecular entre 4 e 5 kDa.

EI-Refai; Abdel-Fattah; Mostafa (2009) estudaram fatores que afetam a massa molecular da levana produzida por síntese enzimática pela LS de *Bacillus circulans*. A quantidade de enzima, 300 a 900 U.mL<sup>-1</sup>, não influenciou significativamente, mas o aumento da sacarose diminuiu a massa molecular em até 32%. Quando a temperatura aumentou de 25 para 30°C houve um aumento, mas temperaturas acima de 30°C diminuíram a massa molecular da levana. O aumento do tempo de reação, de 6 para 24 h, aumentou a massa molecular de 10 para 38 kDa.

Batista et al., 2010 avaliaram a produção e distribuição da massa molecular da levana produzida por *Z. mobilis* CP4 (ATCC 31821) em caldo de cana-de-açúcar. Foi utilizado um delineamento central composto com dois blocos ortogonais e rotacionais: (1) fatorial completo 2<sup>3</sup> para avaliar o efeito do pH, tempo de cultivo e concentração de açúcar (2) mesmas variáveis do bloco 1 foram testadas em um bloco ortogonal ao primeiro, com pontos estrelas ( $\alpha = \pm 1,8$ ). Os resultados mostraram que a massa molecular, determinada em coluna de Sepharose 6B, foi influenciada apenas pelo pH.

Santos et al. (2013) encontraram, a partir de dois delineamentos fatoriais, a condição ótima para produção de levana (111,6 g.L<sup>-1</sup>), obtida por precipitação na proporção 1:3, em 400 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, tal condição foi então, submetida a uma análise da massa molecular e apresentou duas faixas características, 568 e < 50 kDa, correspondendo a 13,39% e 86,61%, respectivamente.

A produção de levana por *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi foi investigada por fermentação em batelada e batelada alimentada em biorreator. Na fermentação em batelada, as concentrações de sacarose variaram entre 20, 160, 200, 250 e 400 g.L<sup>-1</sup>, o pH foi controlado em 3,0, 6,0, 7,0 e 9,0, e a temperatura foi a 20, 25, 37 e 50°C, a velocidade de agitação foi aumentada para 50, 100, 175 e 250 rpm. A melhor produção de levana foi de 61 g.L<sup>-1</sup> em 24 h, com um produtividade de 3,4 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em sacarose a 250 g.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, temperatura 37°C e 175 rpm. A massa molecular teve influência, principalmente, da concentração de sacarose, onde em baixa concentração de sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>), predominou levanas de alta massa

molecular, em alta concentração de sacarose ( $400 \text{ g.L}^{-1}$ ), as levanas de baixa massa molecular predominaram. Em pH 6 e 7, ambas levanas estavam presentes simultaneamente, em pH 9 ocorreu síntese de uma pequena concentração de levana de baixa massa molecular, e não houve produção em pH 3. Na batelada alimentada a síntese de levana atingiu  $100 \text{ g.L}^{-1}$  em aproximadamente 100 h (WU, CHOU; SHIH, 2013).

Nos estudos de Poli et al. (2009), as fontes de carbono glicose, frutose, galactose e sacarose foram testadas para produção de EPS e biomassa de *Halomonas* sp. AAD6 em mesa agitadora. A produção máxima de EPS obtida foi  $1,073 \text{ g.L}^{-1}$  em sacarose, e para a biomassa a glicose foi mais eficiente. O meio contendo sacarose foi então, aplicado em uma fermentação em biorreator, e a produção atingiu  $1,844 \text{ g.L}^{-1}$  na fase pré-estacionária. O EPS foi identificado como levana através de análises de RMN e FT-IR e através de análise por coluna de Sepharose CL-6B, foi constatada que a levana produzida apresentou massa molecular acima de 1000 kDa.

Melo et al. (2015) produziram levana de *Bacillus subtilis* natto, a partir de dois delineamentos Box e Behnken, onde foram avaliadas as variáveis pH, tempo e temperatura. De acordo com o modelo, a melhor condição para produtividade de levana foi em pH 8,  $39,5^\circ\text{C}$  em 21 horas, na qual obteve-se  $5,82 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . A levana apresentou duas faixas de massa molecular, 72,37 e 4146 kDa, equivalente à 95 e 5% da amostra, respectivamente.

### **3.3. Modificações na Estrutura Química de Polissacarídeos**

Os polissacarídeos podem ser caracterizados quanto à estrutura molecular, ligação glicosídica da cadeia principal, grau de ramificação, composição de açúcar e conformação das principais cadeias. Tais características são amplamente exploradas, pois interferem na atividade biológica, e com o objetivo de aumentá-la, estudos recentes buscam manipular a estrutura molecular dos polissacarídeos através de modificações químicas. Entre estas estão a acetilação; benzoilação; aminação; fosforilação e sulfatação, que podem conferir algumas vantagens ao polissacarídeo, como ação antioxidante e antitumoral. Os novos grupos químicos, provenientes das modificações, podem ser introduzidos na cadeia em diferentes graus de substituição (DS) (QI et al., 2006; SHI et al., 2007; WANG et al., 2009; YANG et al.; 2011;).

Para estudar a estrutura molecular do EPS, em sua forma nativa ou modificada, podem ser utilizados diferentes métodos, como RMN e FT-IR (MA et al.,

2012). Em estudo com diversas modificações na estrutura da levana, como acetilação, fosforilação e benzoilação, as análises em FT-IR e RMN revelaram que os grupos iônicos foram introduzidos com sucesso. No espectro de FT-IR para levana acetilada, uma nova absorção apareceu em  $1735\text{ cm}^{-1}$ , que foi atribuída à vibração de estiramento da ligação C=O, e um forte aumento da absorção a  $1250\text{ cm}^{-1}$ , demonstrando que o derivado acetilado foi sintetizado. No derivado fosforilado, várias novas bandas apareceram, a banda em  $1248\text{ cm}^{-1}$  foi devido à vibração de estiramento de P=O, enquanto que o sinal fraco em  $988\text{ cm}^{-1}$  correspondeu à ligação P-O, assim, os resultados indicaram que ocorreu a fosforilação. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da levana acetilada, o sinal a 2,17 ppm foi atribuído aos hidrogênios metílicos dos grupos acetoxilas. Para levana fosforilada os picos na região de 0,4 a 2,5 ppm foram atribuídos aos sinais de grupos fosfato (LIU et al., 2012; ZHANG et al., 2009).

Além da levana, diversos polissacarídeos estão sendo submetidos à processos de modificações químicas, já que a forma modificada pode apresentar melhores resultados em suas aplicações, principalmente na área da saúde, quando comparada com a forma nativa, como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2** – Polissacarídeos modificados de diversas origens com atividade biológica na área da saúde.

Polissacarídeo/Origem	Modificação	Atividade Biológica	Referência
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Fosforilação	Antioxidante	GUO et al., 2013
Seda do milho solúvel em água (CSPS)	Sulfatação Acetilação Carboximetilação	Antioxidante	CHEN et al., 2013
Algas marinhas 11 espécies	Sulfatação	Antioxidante	COSTA et al., 2010
<i>Lachnum</i> YM405	Sulfatação Fosforilação	Antioxidante Antitumoral	HE et al., 2014
<i>Ganoderma atrum</i>	Acetilação Carboximetilação	Antitumoral Imunomodulatória	CHEN et al., 2014
<i>Sargassum horneri</i>	Sulfatação	Antioxidante Antitumoral	SHAO; CHEN; SUN, 2014

**Fonte:** o próprio autor.

Um polissacarídeo extraído de *Ganoderma atrum* foi quimicamente modificado para gerar derivados acetilados e carboximetilados, sendo confirmados por FT-IR e  $^{13}\text{C}$  RMN. A massa molecular dos derivados diminuiu devido a uma ligeira degradação durante a reação. Os resultados mostraram que o derivado acetilado com grau de substituição adequado e baixa massa molecular exibiu capacidades

antioxidantes mais fortes sob DPPH. Além disso, aumentou a capacidade imunomodulatória, através de fagocitose de macrófagos, e secreção de fator de necrose tumoral  $\alpha$ . O derivado carboximetilado mostrou ser menos eficaz. Estes resultados indicaram também que o tipo de grupo e o seu grau de substituição, têm um papel essencial nas atividades biológicas dos derivados (CHEN et al., 2014).

Guo et al. (2013) isolaram e purificaram um polissacarídeo produzido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. O EPS foi fosforilado através de hexametáfosfato de sódio, gerando assim o derivado. A espectroscopia de absorção UV-vis foi usada para medir a pureza do EPS e os espectros de infravermelho foram utilizados para analisar a estrutura dos EPSs. Ambos exibiram ação antioxidante *in vitro*, através da eliminação do ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , radical hidroxila  $OH^{\cdot}$  e DPPH. Em um experimento *in vivo*, também aumentaram a atividade da catalase, superóxido dismutase e da glutathione peroxidase no soro e fígado de ratos, bem como, diminuíram os níveis de malondialdeído. Além disso, altas doses do EPS nativo e modificado podem prevenir a progressão do estresse oxidativo induzido por D-galactose em hepatócitos, sendo que o EPS fosforilado se mostrou mais eficaz que o EPS nativo na ação antioxidante *in vivo* e *in vitro*.

Chen et al. (2013) testaram a atividade antioxidante e inibitória da  $\alpha$ -amilase de um polissacarídeo da seda do milho solúvel em água em sua forma nativa e seus derivados, sulfatado, acetilado e carboximetilado. Os espectros de FT-IR foram utilizados para analisar e comparar as modificações. Novos picos de absorção surgiram para os derivados, sugerindo a introdução dos novos grupos químicos. O polissacarídeo carboximetilado demonstrou maior solubilidade, distribuição de massa molecular mais estreita, menor viscosidade intrínseca, conformação hiperramificada, e maior capacidade antioxidante e inibitória da  $\alpha$ -amilase, em comparação com o polissacárido nativo e outros derivados, assim, o derivado pôde ser considerado um novo agente nutracêutico para consumo humano.

Polissacarídeos provenientes de *Inonotus obliquus* foram submetidos aos processos de sulfatação, acetilação e carboximetilação, apresentando graus de substituição equivalente à 0,44, 0,31 e 0,35, massa molecular (kDa) de 5,22, 10,32, 2,68, e viscosidade intrínseca ( $\eta$ ), 1,38, 1,22 e 0,82, respectivamente, enquanto o polissacarídeo nativo possui massa molecular em 12,20 e viscosidade intrínseca, 7,69, havendo assim, uma diminuição nestes valores após a modificação. Quando testados quanto à atividade antioxidante, pelo método de redução do ferro e inibição

dos peróxidos lipídicos do fígado, o polissacarídeo nativo e seus derivados exibiram capacidade de inibição dos radicais livres (MA et al., 2012).

### 3.4. Aplicações da Levana

Para a indústria, a levana pode desempenhar diversas funções, de acordo com suas características, sendo utilizada como agente estabilizador, emulsificante, espessante, encapsulante, osmorregulador e crioprotetor (BEKERS et al., 2005). Pode ser usada como substituinte do açúcar devido às baixas calorias e também atua auxiliando a microflora intestinal, já que é um estimulante da proliferação de bactérias probióticas. Destacam-se as aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêuticas e cosméticas (CHUNG-JEN et al., 2009). A Tabela 3 apresenta algumas aplicações em diversas áreas.

**Tabela 3 – Aplicações industriais da levana.**

Aplicação	Uso	Referências
Industrial	Promover viscosidade	Shih et al., (2005)
	Capacidade de se a ligar água e a compostos químicos	Ramsay, (1987)
	Agente tamponante	Gabbitto et al., (2001)
	Substituto do plasma sanguíneo	Shih et al., (2005) e Kirk et al., (1991)
Médico/Farmacêutico	Agente hipocolesterolêmico	Ammar et al., (2002)
	Modificação da membrana celular (células tumorais)	Shih et al., (2005) e Ahmed et al., (2005)
	Substância aglutinante	Ammar et al., (2002), Shih et al., (2005) e Ahmed et al., (2005)
Alimentos	Adoçante	Kirk et al., (1991)
	Substituto da goma arábica	Kirk et al., (1991)
	Agente volumoso	Shih et al., (2005)
	Emulsificante	Shih et al., (2005)
Outros	Agente encapsulante	Shih et al., (2005)
	Cosméticos	Han, (1990) e Ammar et al., (2002)

**Fonte:** Ghaly et al. (2007).

#### 3.4.1. Aplicações na Área Biomédica

Estudos têm mostrado o potencial da levana na área da saúde, como ação antiviral (ESAWY, et al., 2011), antidiabética e hipocolesterolêmica (DAHECH et al., 2011; BELGHITH et al., 2012), antipatogênica (BYUN; LEE; MAH, 2014) e imunoestimulante (DONG et al, 2015). O EPS mostrou ser biocompatível, quando testado em células de osteoblastos e macrófagos de rato, e ainda apresentou efeito protetor contra a atividade tóxica do avarol, indicando uma possível utilização como agente anticancerígeno (POLI et al., 2009). Em estudo *in vivo*, com ratos, a levana

mostrou ser segura, não apresentando nenhuma alteração maléfica (MELO; ZAIA; CELLIGOI, 2012).

Foram avaliados os efeitos da levana sintetizada pelo *B. licheniformis* sob o estresse oxidativo e hiperglicemia. O polissacarídeo foi adicionado à água de ratos diabéticos (5% m/m) durante dois meses e apresentou um aumento significativo do nível de glicogênio de 52% e uma diminuição do nível de glicose no plasma em 52%. Também causou uma diminuição das substâncias reativas ao ácido tibarbitúrico de 31%, 41%, 39% e 25%, um aumento na atividade antioxidante da superóxido dismutase de 40%; 50%, 44% e 34%, e da catalase, em 18%, 20%, 12% e 18% no fígado, rim, coração e pâncreas, respectivamente. Também foi notada uma diminuição significativa nos índices de toxicidade hepática e renal, como a atividade das fosfatases alcalinas, aspartato e lactato transaminases, bilirrubina total, e níveis de creatinina e uréia. Mostrando assim, que a levana foi capaz de levar o índice oxidativo bem próximo do normal (DAHECH et al., 2011).

Dahech et al. (2013) estudaram uma possível influência da levana contra o estresse oxidativo associado à aterosclerose. Para o estudo, um grupo de vinte e quatro ratos machos foi dividido em quatro subgrupos: (1) grupo de dieta normal (controle); (2) ratos normais que receberam levana; (3) grupo de dieta rica em colesterol e (4) grupo com dieta rica em colesterol que receberam levana 5% (w/w). O polissacarídeo foi adicionado à água de ratos durante dois meses. Os resultados mostram que o tratamento com levana aumentou as atividades das enzimas antioxidantes no plasma através de aumento da superóxido dismutase e catalase em 40% e 28%, respectivamente, no coração. Da mesma forma, os ratos do grupo (4) obtiveram uma mudança positiva no perfil lipídico, diminuindo o colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides, em 50%, 38,33% e 64%, respectivamente.

No estudo de Srikanth et al (2015b) a levana obtida de *Acetobacter xylinum* NCIM2526 foi avaliada quanto a capacidade antioxidante, utilizando o radical DPPH. As concentrações avaliadas foram 0, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000 e 1250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A levana apresentou capacidade de eliminação dos radicais DPPH bem próximas ao ácido ascórbico, utilizado como padrão, atingindo 100% em 1250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Apresentou ainda potencial atividade anti-inflamatória, em um teste *in vitro* realizado pelo método de desnaturação da proteína albumina do soro bovino, utilizando Diclofenaco de sódio como padrão.

As atividades antitumorais têm sido atribuídas, principalmente, aos seus efeitos potencializadores no sistema imune. Alguns polissacarídeos podem possuir efeitos citotóxicos diretos sobre as células tumorais, porém alguns não atacam diretamente estas células, mas produzem os seus efeitos através da ativação de diferentes respostas imunológicas (CHA et al., 2012). Melo et al. (2015) aplicaram a levana,  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , em células de hepatoma humano (HepG2) e avaliaram os efeitos causados através de uma análise metabolômica. A levana promoveu aumento de acetato, alanina, lactato e fosfocreatina, que sugerem uma alteração nas vias metabólicas e o acúmulo do lactato poderia levar à morte celular.

Dahech et al. (2012) testaram a atividade antitumoral de levana produzida a partir de LS parcialmente purificada de *Bacillus licheniformis*, e confirmada por RMN. As células testadas foram HepG2 (hepatoma humana), CaCo2 (linha do Colon) e WRL68 (célula de fígado fetal humana). A levana foi adicionada as culturas nas concentrações de 25 a  $200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Após o período de incubação foi analisado o efeito citotóxico, e inulina foi utilizada para comparação, sendo que em maiores concentrações exibiu atividade antitumoral contra células HepG2.

Em determinados estudos onde a levana apresentou atividade antitumoral, os autores relacionaram sua atividade biológica com a massa molecular. Para Calazans et al. (2000) quanto maior a massa molecular da levana, maior a inibição das células tumorais. Yoo et al. (2004) produziram levanas por *Gluconoacetobacter xylinus*, *Microbacterium laevaniformans*, *Rahnella aquatilis* e *Zymomonas mobilis*, com massas moleculares iguais a 40, 710, 380 e 570 kDa, respectivamente, e aplicaram em carcinoma estomacal humano (SNU-1) e fígado (HepG2) na concentração de  $1000 \text{ ug}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Apenas *G. xylinus* mostrou fraca atividade antitumoral e os autores consideraram que isto está relacionado à sua menor massa molecular (40 kDa), enquanto que as levanas produzidas pelos outros microrganismos apresentaram maior atividade, variando entre 39 e 68% na redução da massa tumoral.

Em outro estudo, a levana bruta (levE) produzida por *Bacillus subtilis* M foi fracionada em F1, F2 e F3, e obteve-se diferentes massas moleculares: 21.8, 13.118, 9.53 kDa, respectivamente, sendo determinado em um viscosímetro. As células utilizadas para o estudo foram de fígado humano (Hepa1c1c7). LevE e F3 possuíram maior afinidade de eliminação de radicais ROO e OH e os resultados mostraram uma atividade quimio-preventiva do câncer: levE e suas 3 frações foram promissoras inibidores da atividade do citocromo P-450 redutase (catalisa a formação

de metabólitos pro-carcinogênicos), e indutores da atividade de glutathione-S-transferase (catalisa a desintoxicação enzimática destes metabólitos pro-carcinogênicos). Foi testado também, em esplenócitos, o efeito da levana bruta, suas frações, e paclitaxel na fragmentação do DNA (%) e no tipo de morte celular (apoptose e necrose), sendo monitorado através da coloração laranja de brometo de etídio/acridina. As frações 1 e 3 inibiram a fragmentação do DNA e nenhuma das amostras testadas desencadeou apoptose ou necrose em esplenócitos, exceto F2 (ESAWY et al., 2013b).

Além da massa molecular, estudos tem demonstrado que as modificações na estrutura química podem influenciar a atividade antitumoral da levana. No estudo de Liu et al. (2012) a levana produzida por *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 foi purificada por cromatografia de DEAE-52 e Sephadex G-100, gerando duas frações de levana. A fração EPS-1 (1218 kDa) foi escolhida para gerar as modificações na levana: benzoilação (BL), acetilação (AL) e fosforilação (PL). As modificações foram confirmadas por RMN e FT-IR e levaram a uma diminuição na concentração de açúcares e na massa molecular, resultando em frações com 260 (BL), 973 (AL) e 348 (PL) kDa. A levana foi aplicada em células tumorais gástricas humanas em concentrações variadas, 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os resultados sugeriram que as modificações na levana foram promissoras como agente antitumoral e antioxidante.

Nos estudos de Abdel-Fattah et al. (2012), a levana produzida por *B. subtilis* NRC1aza, confirmada por cromatografia de papel e HPLC, apresentou massa molecular L1, 85.23 e L2, 31.95 kDa, determinado em um viscosímetro. A levana foi sulfatada gerando dois derivados: SL1 e SL2. Ambas, levana nativa (L1 e L2) e derivada (SL1 e SL2) apresentaram atividade antioxidante, com uma forte atividade de eliminação de radicais livres utilizando DPPH. As células tumorais testadas em SL1 foram carcinoma hepatocelular (HepG2), carcinoma do cólon (HCT-116), carcinoma cervical (HeLa), linfoma histiocítico e adenocarcinoma da mama (MCF-7) (ATCC, VA, EUA) e leucemia linfoblástica (1301). A morte celular foi explorada através de uma avaliação da relação de apoptose/necrose; fragmentação do DNA; atividade de histona deacetilase; potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi\text{m}$ ); liberação do citocromo C; total de caspases, caspase-3 e caspase-9; e ciclo celular. SL1 apresentaram alta citotoxicidade seletiva contra células HepG2 e levou ao dano e fragmentação do DNA, que foi associada com apoptose induzida pela via mitocondrial.

A levana produzida por *Bacillus subtilis* NRS1aza foi confirmada por cromatografia de papel e RMN e utilizada na forma bruta e derivada por quaternização. A atividade antiproliferativa de ambas foi avaliada contra linhagem de células de câncer de mama humano MCF-7; linhagem de células de câncer de fígado humano HepG2 e câncer de pulmão A549, usando o método colorimétrico sulforodamina B (SRB), em comparação com cisplatina, como referência de drogas. As atividades antiproliferativas foram expressas por concentração inibitória do crescimento mediano ( $CI_{50}$ ), os resultados mostraram uma potente atividade inibidora de crescimento contra as linhas de células MCF-7 e HepG2, mas sem efeito sobre células A549. A levana derivada pode ser considerada potente e eficaz em comparação com cisplatinina, tanto em células MCF-7 e HepG2 (ESAWY et al., 2013a).

Sarilmiser; Oner (2014) produziram derivados da levana de *Halomonas smyrnensis* AAD6<sup>T</sup> contendo grupos aldeídos, para isso, a levana foi submetida a um processo de oxidação com periodato de potássio ( $KIO_4$ ). De acordo com o tempo de exposição ao  $KIO_4$ , diferentes graus de oxidação (OD) foram obtidos para levana: OL I (1 dia), OL II (2 dias) e OL III (3 dias). O teste in vitro WST-1 para proliferação e viabilidade celular foi utilizado para avaliar a capacidade antitumoral da levana nativa e seus derivados, que foram aplicados, nas concentrações entre 10-1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , em quatro linhagens de células tumorais: adenocarcinoma de pulmão humano (A549); Carcinoma Hepatocelular de fígado humano (HepG2/C3A); adenocarcinoma gástrico humano (AGS) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). Quando comparada com a levana nativa, os derivados, principalmente com maior grau de oxidação (OLIII), obtiveram maior atividade antitumoral, sendo que para ambas, a melhor concentração encontrada foi 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A diminuição da viabilidade das células tumorais foi atribuída a apoptose devido ao aumento da atividade da caspase-3/7.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Microrganismo**

O microrganismo utilizado foi o *Bacillus subtilis* natto CCT 7712, isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia do alimento japonês natto e identificado pela Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia. Para preservação, o *B. subtilis* natto foi crescido em meio composto por (g.L<sup>-1</sup>): peptona, 50; extrato de carne, 30; ágar, 20, durante 24 h a 37°C, e mantido a 4°C em câmara refrigerada. O repique das células foi realizado a cada 45 dias. A verificação da pureza foi observada por coloração de gram.

### **4.2. Inóculo**

Para o preparo do inóculo foi realizada uma fermentação em batelada, utilizando meio de cultivo composto por (g.L<sup>-1</sup>): sacarose, 100; extrato de levedura, 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 0.5 (CALAZANS et al., 2000), ao qual foi inoculado o microrganismo preservado (item 4.1). Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, com 25 mL de meio de inóculo, incubados em shaker orbital a 37° C, 150 rpm durante 24 h e interrompidos por centrifugação a 9050 x g durante 15 min. As células foram suspensas em solução salina e a concentração foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro ( $\lambda=600$  nm) e os valores obtidos, correlacionados com a curva de biomassa em g.L<sup>-1</sup>. O inóculo foi padronizado em 0,2 g.L<sup>-1</sup> para todas as fermentações.

### **4.3. Meios e Condições de Cultivo**

Foram realizadas fermentações sem frascos de Erlenmeyer e biorreator. O meio de cultivo utilizado nas fermentações foi composto por(g.L<sup>-1</sup>): extrato de levedura 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,0; MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) 0,6; MnSO<sub>4</sub> 0,2 e citrato de amônio, 0,25 (EUZENAT, GUIBERT, COMBES, 1997, modificado). A interrupção dos cultivos foi realizada por centrifugação a 9050 x g por 15 minutos a 4°C. No sobrenadante foram determinadas a biomassa (item 4.4.1), os açúcares totais para a verificação do consumo (item 4.4.2), a produção de levana (item 4.4.4) e avaliação da massa molecular (item 4.4.6), e atividade enzimática (item 4.4.5).

### 4.3.1. Fermentações em Erlenmeyer

Para produzir levanas com maiores massas moleculares, as fermentações foram realizadas utilizando frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de volume de trabalho incubados a 37°C e 160 rpm, por 24h. A concentração de sacarose variou entre 80 e 220 g.L<sup>-1</sup>, de acordo com o planejamento fatorial (Tabela 4). Foi realizado um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>, incluindo 4 pontos axiais e 2 repetições no ponto central (Tabela 4) as variáveis independentes foram: (X1) concentrações de sacarose (80 a 220 g.L<sup>-1</sup>) e (X2) pH (5,1 a 7,9). A escolha dos níveis e fatores utilizados neste delineamento foi baseada em experimentos prévios, dados obtidos anteriormente pelo grupo de estudo, e também de acordo com a literatura. Desse delineamento a melhor condição obtida de produção de levana foi submetida às fermentações em biorreator (item 4.3.2).

**Tabela 4** - Delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> para avaliar a influência das variáveis independentes: (X1) concentrações de sacarose, (X2) pH na produção de levana de *B. subtilis* natto. As fermentações foram realizadas por 24 h, a 37° C e 160 rpm.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	x1	x2	Sacarose	pH
1	-1	-1	100	5,5
2	-1	1	100	7,5
3	1	-1	200	5,5
4	1	1	200	7,5
5	-1,41	0	80	6,5
6	1,41	0	220	6,5
7	0	-1,41	150	5,1
8	0	1,41	150	7,9
9	0	0	150	6,5
10	0	0	150	6,5
11	0	0	150	6,5

Os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA 7.0 para análise de variância (ANOVA) com índice de confiança de 0,05 e metodologia de superfície de resposta (MRS) (STATISTICA Inc. Tulsa - USA, 2006).

### 4.3.2. Fermentações em Biorreator

A melhor produção obtida no item 4.3.1 foi transferida para um biorreator de bancada. O biorreator utilizado foi Bio-tec (Tecnal), equipado com sensor de pH (Mettler Toledo) e temperatura (Pt-100 classe A, Mettler Toledo) com

capacidade para 4,5 L, com 2 L de volume de trabalho. A agitação foi ajustada em 150 rpm, a formação de espuma foi contida pela adição de óleo de canola, e o pH foi ajustado com adição de HCl ou NaOH, através das bombas peristálticas conectadas. Foram realizadas três fermentações: Fermentação 1 (B1), realizada com pH controlado e fixo (6,5) durante todo o processo, Fermentação 2 (B2), o pH inicial foi ajustado, porém sem controle durante o processo (as fermentações 1 e 2 tiveram a aeração definida em  $0,5 \text{ v.v}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) e Fermentação 3 (B3), na melhor condição de pH obtida das fermentações anteriores e com a aeração de  $2 \text{ v.v}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . Foram coletadas amostras das fermentações a cada duas horas e avaliadas a produção de levana, atividade enzimática, biomassa e consumo de açúcar, e a cada seis horas, foi avaliada a massa molecular da levana.

#### **4.4. Determinações Bioquímicas e Analíticas**

##### **4.4.1. Quantificação da Biomassa**

Os cultivos foram interrompidos por centrifugação nos tempos estipulados, o sedimento celular foi ressuspenso em solução salina (0,9%) e determinada a biomassa a  $\lambda = 600 \text{ nm}$ . Os valores obtidos foram correlacionados com a curva de biomassa.

##### **4.4.2. Dosagem dos Açúcares Totais (AT)**

Os açúcares totais do final das fermentações e as amostras coletadas na coluna de exclusão molecular (item 4.3.3.6) foram quantificados pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e as absorbâncias medidas a  $\lambda = 490 \text{ nm}$ . Para a confecção das curvas padrões, foram utilizados padrões de glicose variando as concentrações entre 0 a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

##### **4.4.3. Separação e Purificação da Levana**

Após a interrupção dos cultivos, a levana foi obtida do sobrenadante através de precipitação com etanol absoluto. Para isto, foram testadas três proporções de etanol (meio fermentado:etanol), 1:0,75, 1:1,5 e 1:3, sendo escolhida a proporção 1:1,5 (PORRAS-DOMINGUES et al., 2015). Em seguida, foi mantida em repouso por 12 horas a  $4^\circ\text{C}$  e centrifugada a  $18620 \times g$  durante 20 minutos. O precipitado obtido foi dialisado contra água destilada por 48 horas para remover resíduos provenientes da fermentação com baixa massa molecular. O dialisado foi congelado e liofilizado.

#### 4.4.4. Quantificação de Levana

Após a separação da levana, o precipitado foi submetido à hidrólise ácida com HCl 0,1 M durante 1 h, a 100° C (VIKARI e GISLER, 1986). A solução foi neutralizada com NaOH 1 M e a frutose resultante foi quantificada através de açúcares redutores segundo Somogyi (1952) e Nelson (1944).

#### 4.4.5. Atividade Enzimática

A atividade de LS foi determinada através da formação de levana sob condições controladas. Em um eppendorf foram pipetados 250 µL do extrato bruto (sobrenadante) e 250 µL de sacarose 1 M em 500 µL de tampão acetato 50 mM, pH 5,0 e foram incubados a 30° C durante 2 h. A reação foi interrompida em banho fervente por 10 min. A levana resultante foi precipitada na proporção 1:1,5 (meio fermentado: etanol) e quantificada segundo o item 4.3.3.4. Uma unidade de atividade (UA) é expressa pela quantidade de enzima necessária para a polimerização de 1 µmol de frutose em 1 min sob as condições experimentais (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999).

#### 4.4.6. Estimativa da Massa Molecular da Levana

Após a obtenção da levana (item 4.3.3.3), esta foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sepharose 6B. Este gel é de agarose a concentração 6%, com partículas de diâmetro de 45-165 µm, tem intervalo de fracionamento para polissacarídeos  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$  (COLLINS, 1995).

Uma coluna cromatográfica, de 1.6 cm de diâmetro X 40 cm comprimento e volume total de 80,43 mL foi preenchida com o gel de Sepharose 6B. O tampão fosfato 50 mM em pH 7,0, previamente desaerado em Kitassato, a vácuo, foi usado como eluente. A vazão do eluente foi de 14 mL.h<sup>-1</sup>, controlada por bomba peristáltica. Para cálculo do volume morto, foi usado blue dextrana, 1mg.mL<sup>-1</sup>. As amostras de 0,5 mL foram aplicadas a 4 mg.mL<sup>-1</sup>. Os açúcares eluídos foram dosados pelo método fenol-sulfúrico (item 4.3.3.2). Cada tubo de eluição correspondeu a um volume de 3,5 mL coletados a cada 15 minutos. A partir de padrões de dextrana de *Leuconostoc mesenteroides*, com massas de 50, 150, 410 e 670 kDa foi confeccionada uma curva de calibração.

#### 4.5. Modificação da Levana por Acetilação

Foram realizadas duas reações de modificação. A primeira reação para obter levanas com alto grau de acetilação foi realizada conforme descrito por Grondahl; Teleman; Gatenholm (2003), com algumas modificações. A levana (1.5 g) foi dissolvida em 200 mL de piridina, que também foi utilizada como catalisador da reação, e 70 mL de anidrido acético foram adicionados. O sistema foi submetido a agitação magnética a temperatura ambiente durante 24 h, e em seguida, 100 mL de água destilada foi adicionada para interromper a reação. A solução resultante foi neutralizada com solução de HCl 1 M. O precipitado obtido foi separado por centrifugação a 14000 rpm por 20 min e dialisado durante 96 h contra água destilada. O remanescente foi liofilizado para obter a levana acetilada 1 ( $L_{ac1}$ ). A segunda reação para obter levanas com menor grau de acetilação, foi realizada segundo Liu et al. (2012), com algumas modificações. A levana (1.5 g) foi solubilizada em 75 mL de formamida e 37.5 mL de anidrido acético foram adicionados. A mistura foi deixada sob agitação magnética na temperatura de 45°C durante 6 h, e em seguida, 50 mL de água destilada foi adicionada para interromper a reação. A mistura foi submetida à diálise durante 96 h contra água destilada a temperatura ambiente. O remanescente foi liofilizado para obter a levana acetilada 2 ( $L_{ac2}$ ).

A acetilação foi confirmada com base na análise dos espectros de RMN<sup>1</sup>H e FT-IR. O grau ou percentual de acetilação foi obtido a partir dos espectros de RMN<sup>1</sup>H, através da razão entre o valor de integração dos sinais referentes aos grupos acetoxilas e a integração dos sinais referentes aos hidrogênios carbinólicos da levana. Considerando que, se a acetilação for completa, a razão entre a integração dos 9 hidrogênios das acetoxilas disponíveis e a integração dos 7 hidrogênios carbinólicos resultará em um valor de 1,29 (fator de 100% de acetilação).

#### 4.6. Caracterização da levana por RMN e FT-IR

As amostras de levana e seus derivados, após liofilização, foram confirmadas através de espectros de RMN<sup>1</sup>H e FT-IR. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registados em 25°C, utilizando espectrômetro 400 MHz (frequência de hidrogênio) NMR Bruker Avance III. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm. A levana nativa e  $L_{ac2}$  foram dissolvidas em solução de água deuterada ( $D_2O$ ), e  $L_{ac1}$  foi dissolvida em piridina deuterada ( $C_5D_5N$ ), devido a diminuição da polaridade. Os espectros IR  $\nu_{max}$  KBr  $cm^{-1}$  das amostras de levana foram

obtidos com IRPrestige-21 (Shimadzu®, Kyoto, Japão).

#### 4.7. Potencial Biomédico da Levana Nativa e Modificada

##### 4.7.1. Atividade Antioxidante

O ensaio para investigar a atividade antioxidante da levana nativa (Levana) e acetilada ( $L_{ac1}$  e  $L_{ac2}$ ) foi realizado utilizando o método *in vitro* do DPPH, baseado na captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), conforme descrito por Srikanth et al. (2015b), com algumas modificações. O DPPH foi dissolvido em etanol para obter a concentração de 0,1 mM. As soluções teste foram preparadas a partir da dissolução de diferentes concentrações de levana (0,05; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>) em solvente DMSO (GERHÄUSER et al., 2003). A mistura de reação foi composta por 1 mL da solução teste e 0,3 mL da solução de DPPH, que foi incubada em ambiente escuro por 30 min em temperatura ambiente. Após, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 517 nm. Para o branco, utilizaram-se todos os componentes e etanol ao invés da solução de DPPH. Para o controle utilizaram-se todos os componentes e água ao invés da solução teste. Uma solução de ácido ascórbico (Vit. C) foi utilizada como padrão do ensaio. A taxa de inibição (%) do radical livre foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \left( \frac{\text{Abs. do controle} - \text{Abs. da amostra}}{\text{Abs. do controle}} \right) \times 100$$

##### 4.7.2. Avaliação dos Efeitos Citotóxicos

Para avaliar o efeito citotóxico da levana, foi utilizada a linhagem celular de hepatoma humano (HepG2/C3A), obtida do banco de células do Rio de Janeiro, cultivada em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA). Os frascos foram mantidos em estufa de CO<sub>2</sub> 5% com atmosfera úmida à 37°C.

A investigação dos efeitos citotóxicos foi realizada apenas com a levana nativa ( $L_{at}$ ) e acetilada 2 ( $L_{ac2}$ ), devido às limitações quanto à solubilidade de  $L_{ac1}$ , utilizando o reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Este método permitiu verificar citotoxicidade e viabilidade celular. Nas células vivas, o sal de tetrazolium MTT é reduzido a formazan (1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difenilformazan) e após sua diluição, pode ser analisado colorimetricamente.

A redução do sal MTT é geralmente atribuída à atividade mitocondrial. Dessa, forma quanto maior o número de células viáveis, maior é o valor da absorbância. O ensaio de citotoxicidade com o uso do MTT foi baseado no protocolo descrito por Mossmann (1983), com modificações.

Para este experimento, foram semeadas  $2 \times 10^4$  células diluídas em 100  $\mu\text{L}$  de meio por poço em placas de 96 poços, com posterior incubação destas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas para estabilização do ciclo celular. Decorrido o período, os tratamentos foram adicionados, sendo a levana nativa e acetilada 2 ( $\text{L}_{\text{ac}2}$ ), nas concentrações de 0,1, 0,15, 0,25, 0,5, 0,75, 1 e 3  $\text{mg.mL}^{-1}$ . As células HepG2/C3A foram encubadas por um período de 24 horas. Após o período de exposição, todo o conteúdo dos poços foi retirado e 100  $\mu\text{L}$  de MTT  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (diluído em meio de cultura sem soro) foi adicionado por poço. As células foram novamente incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 4 horas com posterior retirada do MTT, seguido pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, para completa dissolução dos cristais de formazan. A análise foi realizada em espectrofotômetro (Thermoplate) a 540 nm e o sistema foi avaliado a partir de três repetições biológicas com três replicatas técnicas. O percentual de Viabilidade Celular foi obtido através do seguinte cálculo: Percentual de Viabilidade Celular =  $(\text{Absorbância Média de Tratamento} / \text{Absorbância Média de Controle}) \times 100$ . Foram realizados três experimentos contendo triplicatas para cada experimento.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de artigo científico e resultados complementares:

**5.1. Artigo 1: Modificação da levana de alta massa molecular produzida por *Bacillus subtilis* natto para potencial aplicação biomédica**

**5.2. Resultados complementares: Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca e levana de alta massa molecular**

## 5.1. Artigo 1

### **MODIFICAÇÃO DA LEVANA DE ALTA MASSA MOLECULAR PRODUZIDA POR *Bacillus subtilis* natto PARA POTENCIAL APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Janaina Mantovan, Gabrielly Terassi Berssaneti, Adrivanio Baranoski, Mario Sérgio Mantovani, César Cornélio Andrei, Dionísio Borsato e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

## Carbohydrate Polymers

**Modificação da levana de alta massa molecular produzida por *Bacillus subtilis* natto para potencial aplicação biomédica**

Janaina Mantovan<sup>1</sup>, Gabrielly Terassi Berssaneti<sup>1</sup>, Adrivanio Baranoski<sup>3</sup>, Mario Sérgio Mantovani<sup>3</sup>, César Cornélio Andrei<sup>2</sup>, Dionísio Borsato<sup>2</sup> e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>1</sup>

**Resumo**

O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção, massa molecular e potencial aplicação biomédica da levana de *B. subtilis* natto, em sua forma nativa e acetilada. Através de um planejamento fatorial, foi determinada a melhor condição para produção de levana (185 g.L<sup>-1</sup> sacarose e pH 6.5), obtendo-se 17.17 g.L<sup>-1</sup> de levana com 44.8% da massa molecular  $\geq$  670 kDa. Esta condição foi aplicada em biorreator, onde foram realizadas três fermentações, variando pH e aeração. A maior massa molecular da levana foi 78.5%  $\geq$  670 kDa, obtida na condição sem controle de pH, aeração 0.5 v.v<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>, 6 h. A levana foi acetilada em dois graus (%): L<sub>ac1</sub> (47.3%) e L<sub>ac2</sub> (5.5%). A levana nativa e modificada foram confirmadas por RMN e FT-IR. L<sub>ac1</sub> e L<sub>ac2</sub> exibiram maior capacidade antioxidante, enquanto levana exibiu atividade inibitória contra células de hepatoma humano, indicando que a levana e seus derivados apresentam amplo potencial de aplicação na área da saúde.

**Palavras-chave:** Levana. Massa Molecular. Acetilação. Antioxidante. Antitumoral.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

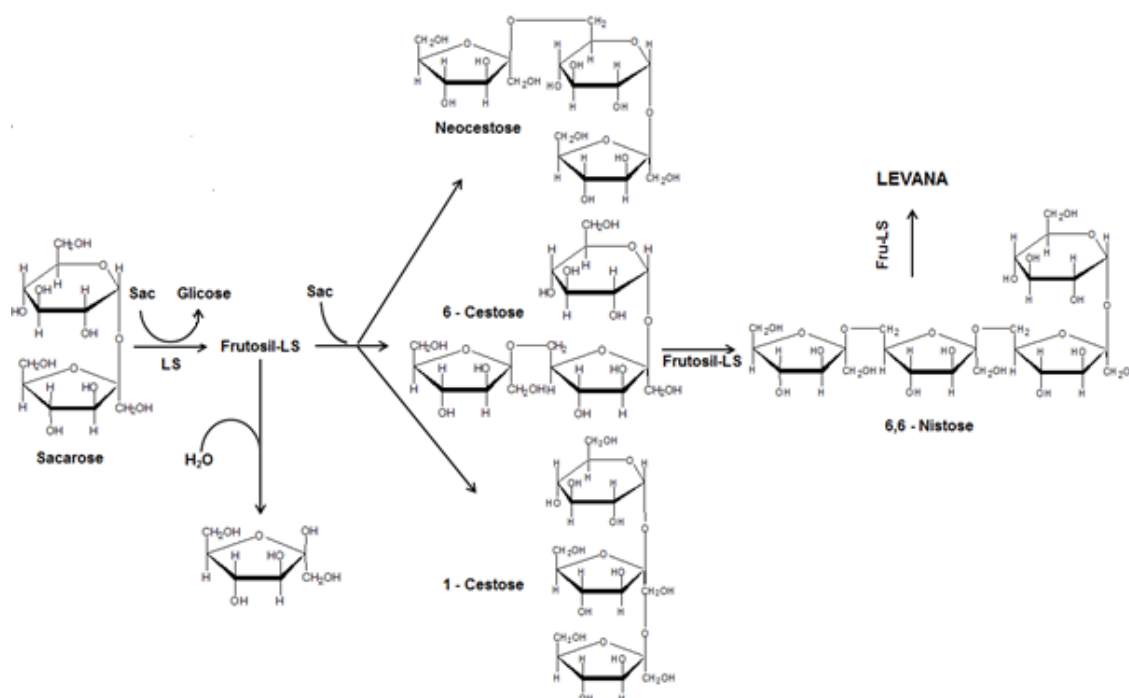
\*Autor correspondente: Tel.: +55 43 33714270. E-mail: macelligoi@uel.br

## 1. Introdução

A levana é um exopolissacarídeo (EPS) constituído predominantemente por resíduos de D-frutose, unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6), com pontos de ramificações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1). Sintetizada pela levanasacarase (LS), uma enzima extracelular que catalisa reação de transfrutossilacção (SRIKANTH et al., 2015a). Pode ser produzida por síntese enzimática e por fermentação microbiana (GONÇALVES et al., 2013), sendo que a fermentação submersa é sistema mais utilizado (SHIH et al., 2011; SILBIR et al., 2014) e destaca-se o *B. subtilis* como um dos microrganismos mais eficientes (MELO et al., 2015).

Para aplicação da levana é preciso estabelecer processos de produção viáveis em maior escala e importantes fatores devem ser avaliados previamente, neste caso a metodologia de planeamento fatorial associada à análise por superfície de resposta (MSR) tem sido amplamente utilizada (BERTÉ et al., 2013). A massa molecular (MW) do EPS produzido também é um importante fator que deve ser analisado, uma vez que pode estar relacionado com a sua atividade biológica (YOO et al., 2004). *B. subtilis* pode produzir, pela ação da enzima, fruto-oligossacarídeos (FOS) e levanas (Fig. 1), sendo que as levanas apresentam maior massa molecular (LI; SEO; KARBOUNE et al, 2015).

O direcionamento da fermentação para produção de EPSs com maior MW envolve a escolha do microrganismo produtor e as condições de cultivo, sendo que pH e sacarose são algumas das variáveis influentes e o *B. subtilis* natto é capaz de produzir levana em uma distribuição bimodal de MW (WU; CHOU; SHIH, 2013). Na etapa de separação da levana, a proporção de etanol empregado na precipitação, também pode selecionar produtos com diferentes massas moleculares (PORRAS-DOMÍNGUEZ et al., 2015).



**Fig. 1.** Formação de levana e FOS: a sacarose funciona como doador e receptor de grupos frutossil, gerando fruto-oligossacarídeos, através da ação da LS. A levana pode ser formada pelo alongamento da 6-Cestose (enzima ataca O<sup>6</sup> da sacarose).

A levana apresenta diferentes aplicações na área da saúde, como ação antiviral (ESAWY, et al., 2011), antidiabética, hipocolesterolêmica (DAHECH et al., 2011; BELGHITH et al., 2012a), antipatogênica (BYUN; LEE; MAH, 2014), imunoestimulante (DONG et al, 2015) e também mostrou boa capacidade antioxidante. O estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de diversas doenças, inclusive formação de tumores (LIU et al., 2010; DAHEC et al., 2013). As modificações na estrutura química dos EPSs também podem resultar em efeitos positivos para a saúde. Alguns processos descritos, como acetilação, fosforilação e sulfatação resultam em um aumento da atividade biológica, como maior capacidade antioxidante e antitumoral (ABDEL-FATTAH et al., 2012; LIU et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi direcionar a fermentação para a produção de EPSs de alta massa molecular por *B. subtilis* natto, bem como promover modificações químicas nessas moléculas para potencializar sua aplicação biomédica.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Microrganismo e condições de cultivo

*B. subtilis* natto (CCT 7712) foi isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, identificado pela Instituição André Tosello de Pesquisa e Tecnologia e mantido em meio de preservação contendo (g.L<sup>-1</sup>): peptona 5.0; extrato de carne 3.0 e ágar 2.0 a 4 °C. O inóculo foi preparado por fermentação em batelada com meio de cultura contendo (g.L<sup>-1</sup>): sacarose 100; extrato de levedura 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1; MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) 0.5, a 37 °C, 150 rpm, durante 24 h. As fermentações foram padronizadas com inóculo de 0.2 g.L<sup>-1</sup> de células. O meio de cultivo das fermentações foi composto por (g.L<sup>-1</sup>): extrato de levedura 2.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0; MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) 0.6; MnSO<sub>4</sub> 0.2, citrato de amônio 0.25 e a concentração de sacarose variou de acordo com o planejamento estatístico (EUZENAT, GUIBERT, COMBES, 1997, modificado).

#### 2.1.1. Fermentações em frascos Erlenmeyer

Um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> (DCCR 2<sup>2</sup>) com as variáveis: (X<sub>1</sub>) concentração de sacarose (80 a 220 g.L<sup>-1</sup>) e (X<sub>2</sub>) pH (5.1 a 7.9) foi empregado para avaliar a produção de levana, utilizando frascos Erlenmeyer 125 mL com 25 mL de meio de cultivo, incubados a 37°C, 160 rpm por 24 h (Tabela 1). A escolha dos níveis e fatores foi baseada na literatura e experimentos prévios, visando a obtenção de EPSs de maior MW. Os resultados foram analisados pelo STATISTICA 7.0 para análise de variância (ANOVA) e metodologia de superfície de resposta (MRS) (STATISTICA Inc. Tulsa - USA, 2006).

#### 2.1.2. Fermentações em biorreator

O biorreator utilizado foi 4,5 L Bio-tec (Tecnal), equipado com sensor de pH (Mettler Toledo) e temperatura (Pt-100 classe A, Mettler Toledo) com 2 L de volume de trabalho. Agitação em 150 rpm, formação de espuma contida pela adição de óleo de canola, e pH controlado por HCl ou NaOH. Três fermentações foram realizadas: B1, pH controlado em 6.5 e aeração 0.5 v.v<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; B2, pH inicial 6.5, sem controle durante o processo e aeração 0.5 v.v<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e B3, melhor condição de pH obtida das fermentações B1 e B2 e aeração 2 v.v<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Amostras foram coletadas a cada duas horas para avaliar a produção de levana, atividade enzimática, biomassa e consumo de açúcares, e a cada seis horas foi avaliada a massa molecular da levana.

## **2.2. Determinações bioquímicas**

### **2.2.1. Quantificação da biomassa e consumo de açúcar**

Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 9000 rpm por 15 min a 4°C, o sedimento celular foi ressuspensão em solução salina (0.9%) e determinada a biomassa a  $\lambda = 600$  nm. No sobrenadante foi determinado o consumo de açúcar pelo método fenol-sulfúrico,  $\lambda = 490$  nm (DUBOIS et al., 1956).

### **2.2.2. Separação, purificação e quantificação de levana**

A levana foi obtida do meio por precipitação, utilizando três proporções de etanol (meio:etanol), 1:0.75 (75%), 1:1.5 (150%) e 1:3 (300%). Em seguida, foi mantida em repouso por 12 horas a 4°C e centrifugada a 14000 rpm durante 20 min. O precipitado foi dialisado contra água destilada por 48 horas, congelado e liofilizado. Para quantificação, o precipitado foi submetido à hidrólise ácida com HCl 0.1 M durante 1 h, a 100°. A solução foi neutralizada com NaOH 1 M e a LEVANA foi quantificada em frutose, através de açúcares redutores Somogyi (1952) e Nelson (1944).

### **2.2.3. Atividade enzimática**

A atividade de LS foi determinada através da formação de levana. A mistura reacional foi: 250  $\mu$ L de extrato bruto (sobrenadante), 250  $\mu$ L de sacarose 1 M e 500  $\mu$ L de tampão acetato 50 mM, pH 5.0, 30° C durante 2 h. A levana foi estimada e a unidade de atividade (UA) foi expressa pela quantidade de enzima necessária para a polimerização de 1  $\mu$ mol de frutose em 1 min sob as condições experimentais (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999).

### **2.2.4. Estimativa da massa molecular da levana**

A massa molecular da levana foi estimada em uma coluna de Sepharose 6B. As amostras de 0,5 mL foram aplicadas a 4 mg.mL<sup>-1</sup> de LEVANA, tampão fosfato 50 mM, pH 7.0 foi usado como eluente, a vazão controlada em 14 mL.h<sup>-1</sup>. Amostras de 3.5 mL foram coletadas a cada 15 min. As amostras eluídas foram dosados pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956). Uma curva de calibração foi confeccionada padrões de dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* (50, 150, 410 e 670 kDa).

### 2.3. Acetilação

Foram realizadas duas reações de modificação. A primeira reação para obter levanas com alto grau de acetilação foi realizada conforme descrito por Grondahl; Teleman; Gatenholm (2003), com algumas modificações. A levana (1.5 g) foi dissolvida em 200 mL de piridina, que também foi utilizada como catalisador da reação, e 70 mL de anidrido acético foram adicionados. O sistema foi submetido a agitação magnética a temperatura ambiente durante 24 h, e em seguida, 100 mL de água destilada foi adicionada para interromper a reação. A solução resultante foi neutralizada com solução de HCl 1 M. O precipitado obtido foi separado por centrifugação a 14000 rpm por 20 min e dialisado durante 96 h contra água destilada. O remanescente foi liofilizado para obter a levana acetilada 1 ( $L_{ac1}$ ). A segunda reação para obter levanas com menor grau de acetilação, foi realizada segundo Liu et al. (2012), com algumas modificações. A levana (1.5 g) foi solubilizada em 75 mL de formamida e 37.5 mL de anidrido acético foram adicionados. A mistura foi deixada sob agitação magnética na temperatura de 45°C durante 6 h, e em seguida, 50 mL de água destilada foi adicionada para interromper a reação. A mistura foi submetida à diálise durante 96 h contra água destilada a temperatura ambiente. O remanescente foi liofilizado para obter a levana acetilada 2 ( $L_{ac2}$ ).

A acetilação foi confirmada com base na análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) e no infravermelho (FT-IR). O grau ou percentual de acetilação foi obtido a partir dos espectros de RMN<sup>1</sup>H, através da razão entre o valor de integração dos sinais referentes aos grupos acetoxilas e a integração dos sinais referentes aos hidrogênios carbinólicos da levana. Considerando que, se a acetilação for completa, a razão entre a integração dos 9 hidrogênios das acetoxilas disponíveis e a integração dos 7 hidrogênios carbinólicos resultará em um valor de 1,29 (fator de 100% de acetilação).

### 2.4. Caracterização da levana por RMN e FT-IR

As amostras de levana e seus derivados, após liofilização, foram confirmadas através de espectros de RMN<sup>1</sup>H e FT-IR. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em 25°C, utilizando espectrômetro 400 MHz (frequência de hidrogênio) NMR Bruker Avance III. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm. A levana nativa e  $L_{ac2}$  foram dissolvidas em solução de água deuterada ( $D_2O$ ), e  $L_{ac1}$  foi dissolvida em piridina deuterada ( $C_5D_5N$ ), devido a

diminuição da polaridade. Os espectros IR  $\nu_{\max}$  KBr  $\text{cm}^{-1}$  das amostras de LEVANA foram obtidos com IRPrestige-21 (Shimadzu®, Kyoto, Japão).

## **2.5. Potencial Biomédico da levana nativa e modificada**

### **2.5.1. Atividade antioxidante**

O ensaio para investigar a atividade antioxidante da levana e seus derivados foi realizado utilizando o método *in vitro* do DPPH, baseado na captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), conforme descrito por Srikanth et al. (2015b), com algumas modificações. O DPPH foi dissolvido em etanol para obter a concentração de 0.1 mM. As soluções teste foram preparadas a partir da dissolução de diferentes concentrações de levana (0.05; 0.25; 0.5; 1; 2; 3; 4 e 5  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em solvente DMSO (GERHÄUSER et al., 2003). A mistura de reação foi composta por 1 mL da solução teste e 0.3 mL da solução de DPPH, que foi incubada em ambiente escuro por 30 min em temperatura ambiente. Após, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 517 nm. Para o branco, utilizaram-se todos os componentes e etanol ao invés da solução de DPPH. Para o controle utilizaram-se todos os componentes e solução de DPPH ao invés da solução teste. Uma solução de ácido ascórbico (Vitamina C) foi utilizada como padrão do ensaio. A taxa de inibição (%) do radical livre foi calculada conforme a equação 1:

$$\% \text{ inibição} = ((\text{Abs. do controle} - \text{Abs. da amostra}) / \text{Abs. do controle}) \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

### **2.5.2. Avaliação dos efeitos citotóxicos**

O efeito citotóxico na linhagem celular HepG2/C3A da levana e  $L_{ac2}$  foi determinado pelo ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil (MTT) baseado no protocolo descrito por Mosmann (1983), com modificações. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço em 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, cultivadas durante 24 h em atmosfera úmida à 37° C e 5% de  $\text{CO}_2$  para estabilização. Após este período, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura contendo separadamente levana e  $L_{ac2}$  para as concentrações finais de 0.1, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 e 3.0  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Após 24 horas todo o conteúdo dos poços foi removido e 100  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (0.5  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) foi adicionado. As células foram novamente incubadas a 37° C por 4 horas com posterior retirada do MTT, seguido pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, para completa dissolução dos cristais de formazan.

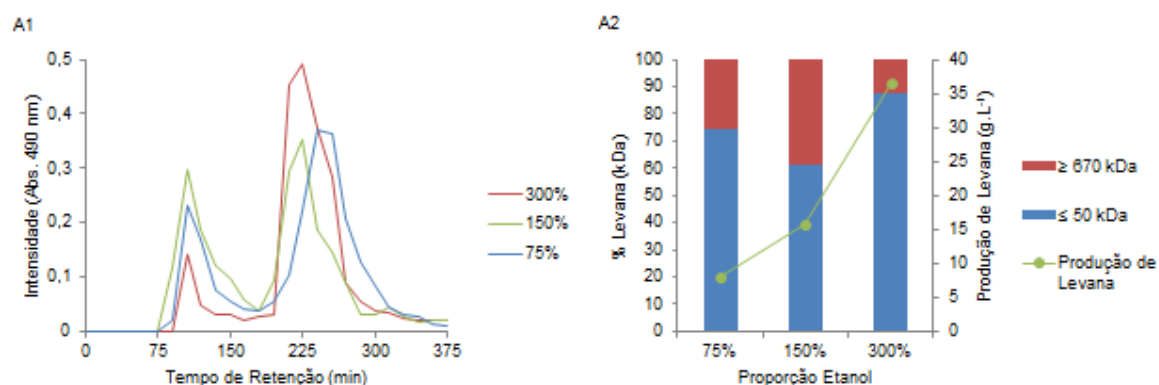
A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Thermoplate) a 540 nm e o sistema foi avaliado a partir de três repetições biológicas com três replicatas por tratamento. O percentual de viabilidade celular foi obtido através do seguinte cálculo:

$$\text{Percentual de viabilidade celular} = (\text{Absorbância Média de Tratamento} / \text{Absorbância Média de Controle}) \times 100 \text{ (Eq.2)}$$

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Produção e avaliação da massa molecular da levana

Para obter EPSs de maior MW neste estudo, em uma primeira etapa, foi utilizado um planejamento fatorial e um gradiente de etanol para precipitação. Assim a levana produzida em 150 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH 6.5, condição referente ao ponto central do DCCR 2<sup>2</sup> (Tabela 1), foi submetida a diferentes precipitações e análise da MW.



**Fig. 2.** Análise do perfil cromatográfico (A1) e produção e avaliação da massa molecular (A2) do EPS produzido por *B. subtilis* em meio contendo 150 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,5 e precipitado em diferentes proporções de etanol (75, 150 e 300%).

A Fig. 2 demonstra que levanas de diferentes MW podem ser separadas por diferentes proporções de etanol e que a quantidade de levana total (A2) aumenta proporcionalmente ao aumento de etanol. Duas faixas principais de MW foram encontradas,  $\leq 50$  kDa (LMWL) e  $\geq 670$  kDa (HMWL). Na proporção (meio:etanol) 1:3 (300%) houve predominância de LMWL. As levanas com maiores MW foram encontradas na proporção 1:1.5 (150%), obtendo-se 39% ( $\pm 1,78$ ) de HMWL. Dados semelhantes aos obtidos por Shih et al. (2005) e Porras-Domínguez et al. (2015). Assim, para as futuras etapas foi utilizada a proporção 1:1.5.

A Tabela 1 mostra a produção de levana e atividade da LS (UA) consumo de açúcares e biomassa de *B. subtilis* variando a sacarose e pH. As maiores produções ocorreram no ponto central (150 g.L<sup>-1</sup> e pH 6.5), atingindo a média de 16.20 g.L<sup>-1</sup> e os ensaios 3 e 8, 15.87 e 15.69 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Maiores produções de biomassa são favorecidas em menores concentrações de açúcar e a atividade enzimática é favorecida por maiores concentrações de sacarose, mas concentrações muito elevadas poderiam inibir a atividade LS (BELGHITH et al., 2012).

**Tabela 1** - Produção de levana, LS, consumo de açúcares e biomassa por *B. subtilis* natto variando sacarose e pH (DCCR 2<sup>2</sup>).

Ensaio	Níveis		Resposta			
	Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	pH Inicial	LEVANA (g.L <sup>-1</sup> )	LS (UA)	Consumo Açúcar (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )
1	100	5,5	7,67	1,16	25,48	1,09
2	100	7,5	12,14	1,44	44,48	1,78
3	200	5,5	15,87	1,43	49,59	1,01
4	200	7,5	13,03	2,14	49,35	1,42
5	80	6,5	11,05	1,32	37,59	1,23
6	220	6,5	13,85	2,21	44,53	1,10
7	150	5,1	9,78	1,19	33,97	1,07
8	150	7,9	15,69	2,03	54,59	1,71
9	150	6,5	16,44	2,08	53,56	1,30
10	150	6,5	16,53	1,97	50,94	1,14
11	150	6,5	15,65	1,91	51,90	1,22
<b>Níveis Reais</b>						
		-1,41	-1	0	1	1,41
X <sub>1</sub>	Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	80	100	150	200	220
X <sub>2</sub>	pH	5,1	5,5	6,5	7,5	7,9

A análise de variância (ANOVA) para a produção de levana (Tabela 2) mostrou que o modelo não apresenta falta de ajuste ( $p = 0.073$ ) e o  $R^2$  obtido foi 0.89, indicando que o modelo é preditivo e pode explicar satisfatoriamente os efeitos da concentração de sacarose e pH na produção de levana pelo *B. subtilis*. A análise de regressão mostrou que as variáveis independentes  $X_1$  e  $X_2$  apresentaram efeito significativo, para produção de levana ( $p \leq 0,05$ ), assim como a interação entre elas,  $X_1.X_2$ . O coeficiente linear de  $X_1$  e  $X_2$  indica que eles interferem positivamente na produção de levana. O modelo quadrático ajustado para a produção de levana por *B. subtilis* natto, contendo as variáveis independentes codificadas, está representado pela equação 3:

$$Y = 16.21 + 1.63.X_1 - 1.98.X_1^2 + 1.25.X_2 - 1.84.X_2^2 - 1.83.X_1.X_2 \text{ (Eq. 3)}$$

Onde Y representa a produção de levana ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $X_1$  e  $X_2$  são as variáveis sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e pH.

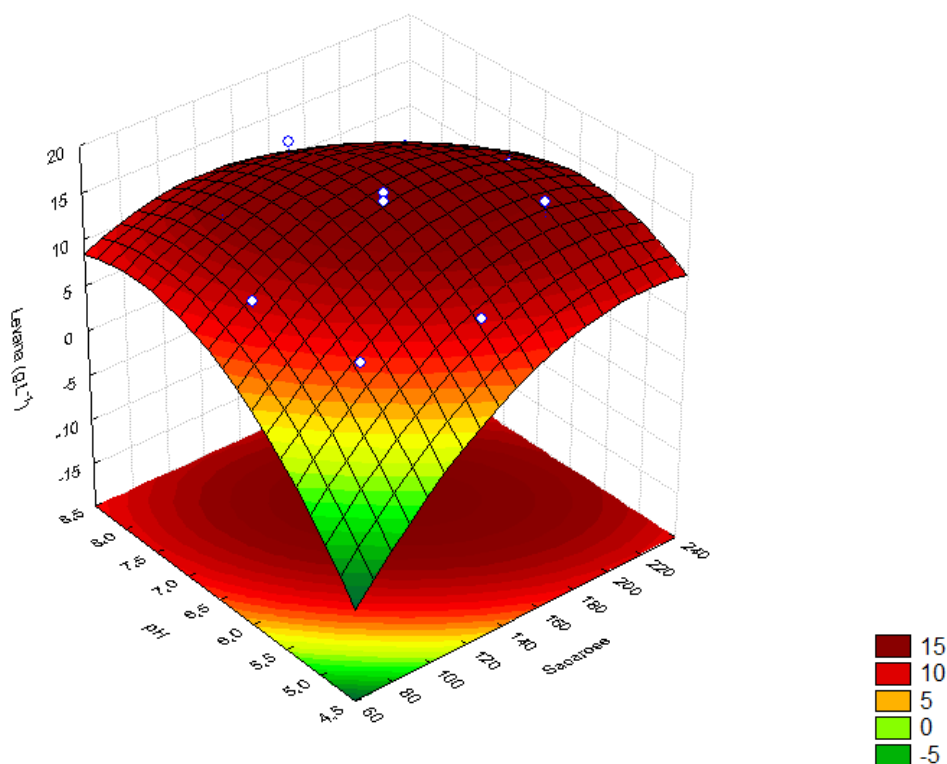
**Tabela 2** – Análise de variância (ANOVA) para produção de levana de *B. subtilis* natto.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p-valor
$X_1$ (L)	1	21.26	21.26	10.88	0.02*
$X_1$ (Q)	1	22.15	22.15	11.33	0.02*
$X_2$ (L)	1	12.44	12.44	6.36	0.05*
$X_2$ (Q)	1	19.09	19.09	9.76	0.03*
$X_1X_2$	1	13.38	13.38	6.84	0.05*
Erro	5	9.78	1.96		
Total	10	88.77			

Lack of fit = 0.072,  $R^2 = 0.89$ , (L) = Linear, (Q) = quadrático.

A partir do modelo obtido foi possível gerar a superfície de resposta, relacionando sacarose e pH (Fig. 3), que indica que a maior produção de levana ocorre em pH 6.5 e sacarose a  $185 \text{ g.L}^{-1}$ . A validação foi conduzida de acordo com a condição ótima predita pelo modelo polinomial. A produção de levana obtida ( $17.17 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi próxima do valor predito ( $16.38 \text{ g.L}^{-1}$ ). De acordo com a análise estatística, não existe diferença significativa ( $p = 0.33$ ) entre  $150$  e  $185 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose para produção de levana, porém a porcentagem de HMWL variou de 39 a 44,81%, respectivamente, aumento de 15%. De acordo com resultados anteriores (dados não mostrados), concentrações muito elevadas de sacarose (acima de  $250 \text{ g.L}^{-1}$ ) levam a uma redução na MW. Assim foi empregada a condição de  $185 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e pH 6.5 para produção em biorreator.

Em estudo anterior deste grupo de pesquisa (MELO et al., 2015), obteve-se apenas 5% de levana de alta massa. O aumento encontrado no estudo atual pode ser devido à diminuição na concentração de sacarose (WU; CHOU; SHIH, 2013) e do pH inicial (BATISTA et al., 2010), bem como o processo de precipitação que foi seletivo para EPSs de alta MW.



**Fig. 3.** Superfície de resposta da produção de levana de *B. subtilis* natto relacionando pH e sacarose.

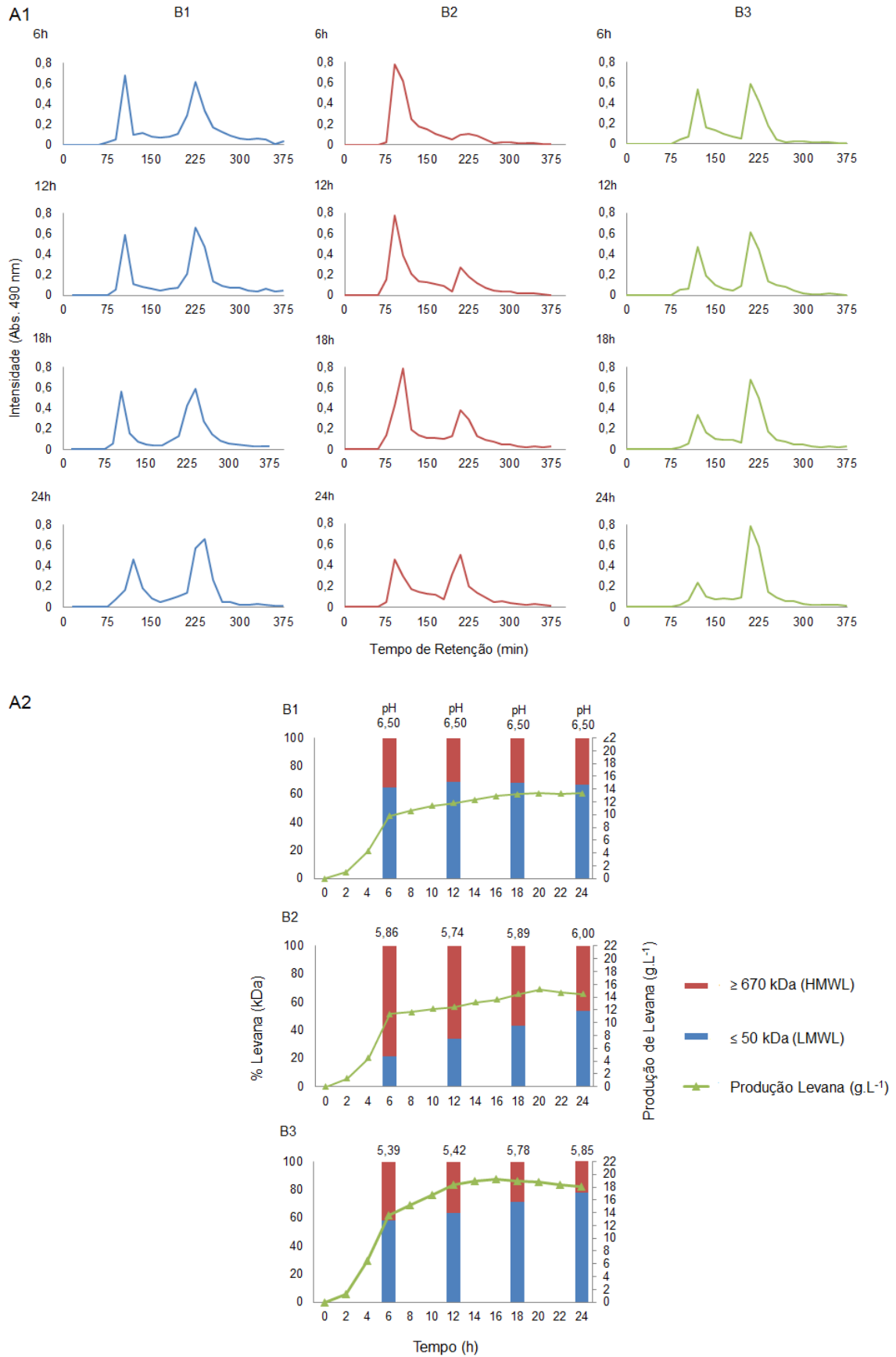
### 3.1.1. Fermentações em biorreator

A análise do perfil cromatográfico (Fig. 4A1) permitiu demonstrar que a levana produzida em biorreator apresentou duas faixas principais de MW,  $\geq 670$  kDa (HMWL) e  $\leq 50$  kDa (LMWL). Conforme mostra a Fig. 4A2, as proporções (%) de HMWL e LMWL e a produção ( $\text{g.L}^{-1}$ ) variaram em B1, B2 e B3, de acordo com o tempo de fermentação e as condições. A Fig. 5 mostra os dados de atividade da LS, produtividade de levana ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), biomassa e consumo de açúcar.

Em B1, as maiores produções de levana (média de  $13.32 \text{ g.L}^{-1}$ ) ocorreram entre 20 e 24 h. Houve predominância de LMWL. Na fermentação sem controle de pH (B2), as produções foram maiores em relação à B1 com  $15.21 \text{ g.L}^{-1}$  em 20 h, no entanto, cerca de 11% inferior à fermentação em frascos de Erlenmeyer. Maior porção de HMWL foi obtida nesta fermentação, 78.5% em 6 h, caindo para 66.2 e 57% em 12 e 18h, respectivamente. Após 24 h as proporções encontravam-se aproximadamente equilibradas. Assim, a condição B2 foi empregada a uma terceira fermentação (B3). A produção de levana aumentou 27% em relação à B2, e 12% comparado à fermentação em frascos de Erlenmeyer. A produtividade foi a maior encontrada ( $2.6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). A maior produção ( $19.3 \text{ g.L}^{-1}$ ) ocorreu em 16 h, tempo

inferior às outras fermentações, assim como a atividade enzimática, média de 2.35 UA entre 12 e 18 h. Em 6 h a porção LMWL representava 58.3% da levana total, passando para 63.4, 71.0 e 77.8% em 12, 18 e 24 h, respectivamente.

A maior produtividade de B1, B2 e B3 ocorreu em 6 h, com queda bastante acentuada nas horas seguintes. As maiores produções de levana e biomassa levaram a um maior consumo de açúcar em B3 e B1, respectivamente. Em B1, o pH controlado durante todo o processo favoreceu a produção de biomassa. Valores de pH em torno de 7.0 são favoráveis ao microrganismo, mas a produção da enzima e da levana ocorrem em valores de pH mais baixos (DONOT et al., 2012).



**Fig. 4.** Perfil cromatográfico (A1), avaliação da massa molecular, produção de levana por *B. subtilis* e pH (A2) em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 h) através das fermentações em biorreator nas diferentes condições (B1, B2 e B3).

Nas fermentações estudadas pode ser observado que a porção HMWL é maior nas primeiras horas (6 h), e diminui em 24 h. Em B3 houve uma queda de 46.8% após 24 h, 41% em B2 e em B1 4.3%. Dados também reportados por Shih et al. (2005), onde a levana de alta massa foi predominante em 7 h. Neste estudo, a HMWL foi sintetizada primeiro, mas degradada com o aumento do tempo de fermentação. Dogsa et al. (2013) relatam que o microrganismo pode utilizar a própria levana como fonte de energia.

Em estudo conduzido através de síntese enzimática, Raga-Carbajal et al. (2015), constataram que a levana de alta massa molecular de *B. subtilis* pode surgir primeiro, porque não depende da levana de baixa massa molecular como precursor. Assim como Porras-Domingues et al. (2015), os autores defendem ainda que concentrações baixas de enzima favorecem a síntese de EPSs maiores e a concentração de sacarose não influencia. No entanto, sob condições microbianas, a alta concentração de sacarose pode levar a maior síntese de LS, que poderia, portanto, levar a síntese de EPSs de baixa massa molecular.

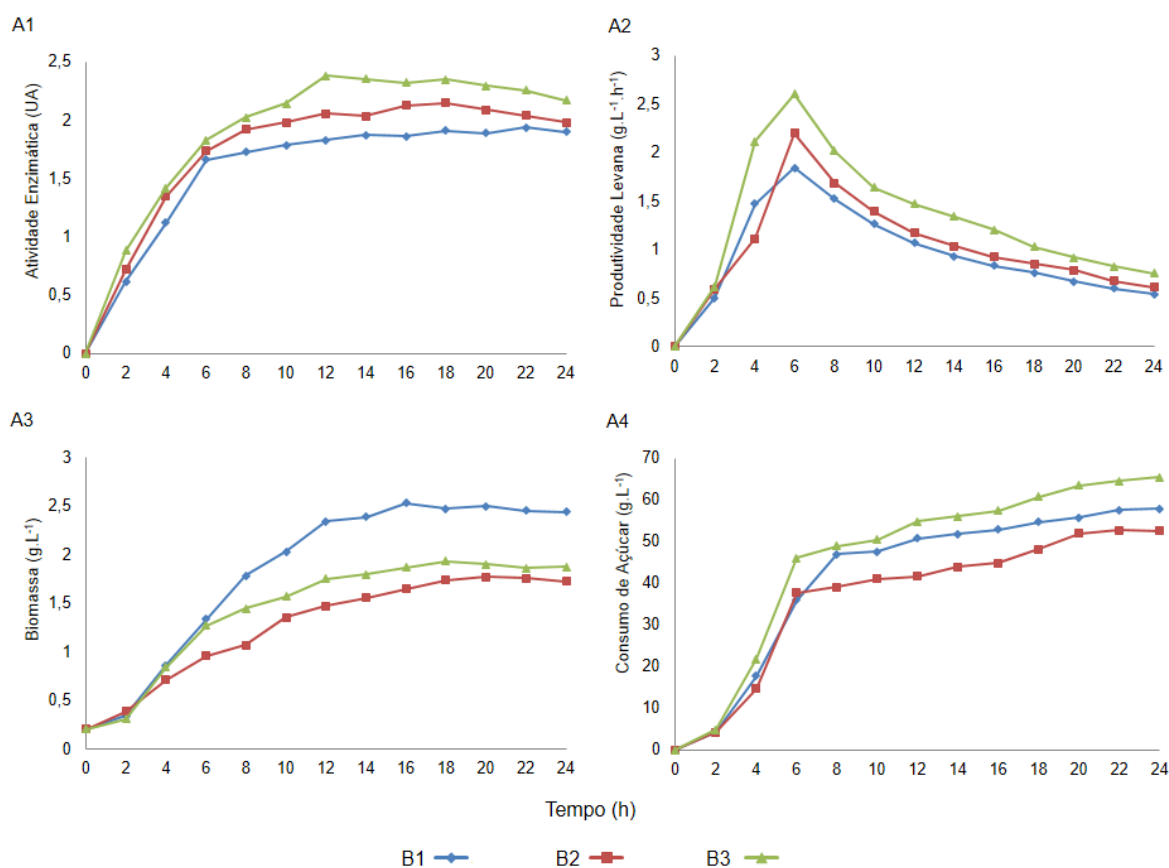
No estudo de Abdel-Fattah, Mahmoud; Esawy (2005) a MW da levana produzida por síntese enzimática sofreu influência da concentração de sacarose e a quantidade de enzima influenciou pouco, mas aumentou a atividade de transfrutoseilação. O alongamento da cadeia de levana depende das reações de transfrutoseilação e o aumento da concentração de glicose, devido à hidrólise da sacarose ao longo do processo fermentativo pode inibir a atividade da LS (DONOT et al., 2012). Além disso, com a hidrólise da sacarose, diminui o principal substrato da enzima, diminuindo a atividade da enzima (VEGA; ZUNIGA-HANSEN, 2014). No estudo atual, a produção de levana e atividade enzimática mostraram tendência para diminuir ao final da fermentação.

Em B2 a diminuição do pH contribuiu para formação de HMWL nas primeiras horas, comparativamente a Batista et al. (2010). O aumento da aeração em B3 favoreceu a produção, mas não a formação HMWL. Os mecanismos exatos que levam a formação de EPSs maiores ou menores ainda não estão completamente elucidados. O microrganismo produtor também pode influenciar. Em geral, uma mesma cepa sintetiza levanas em uma distribuição bimodal de MW, podendo ocorrer exceções (AMMAR et al., 2002; BELGHITH et al. 2012*b*; ZHANG et al., 2013)

O tempo, aeração e pH influenciaram na produção e massa molecular da levana. Sendo que a condição B3, 16 h favorece maiores produções de levana e a

condição B2, 6 h favorece o aumento da HMWL. Esses resultados indicam que a produção em biorreator é favorável, sendo que a condição B2, 6 h foi utilizada para as próximas etapas, conferindo a maior obtenção HMWL em um tempo bastante reduzido.

Esawy et al. (2013b) também observaram vantagens na produção de levana realizada em biorreator, comparada com frascos de Erlenmeyer, sob as mesmas condições. No entanto, contrário a este estudo, na fermentação com pH fixado em 7.0, obteve-se a maior produção de levana, e assim como em B1, a produção de biomassa também foi favorecida. O aumento da produção em biorreator pode ser atribuído ao aumento da aeração e agitação, já que *Bacillus* sp. é um microrganismo altamente aeróbio. Estes dados corroboram com os obtidos neste estudo em B3, onde o aumento da aeração para  $2 \text{ v.v}^{-1}.\text{min}^{-1}$  ocasionou a maior produção de levana.



**Fig. 5.** Avaliação da atividade enzimática (A1), produtividade de levana (A2), biomassa (A3) e consumo de açúcar (A4) por *B. subtilis* nas fermentações em biorreator (B1, B2 e B3).

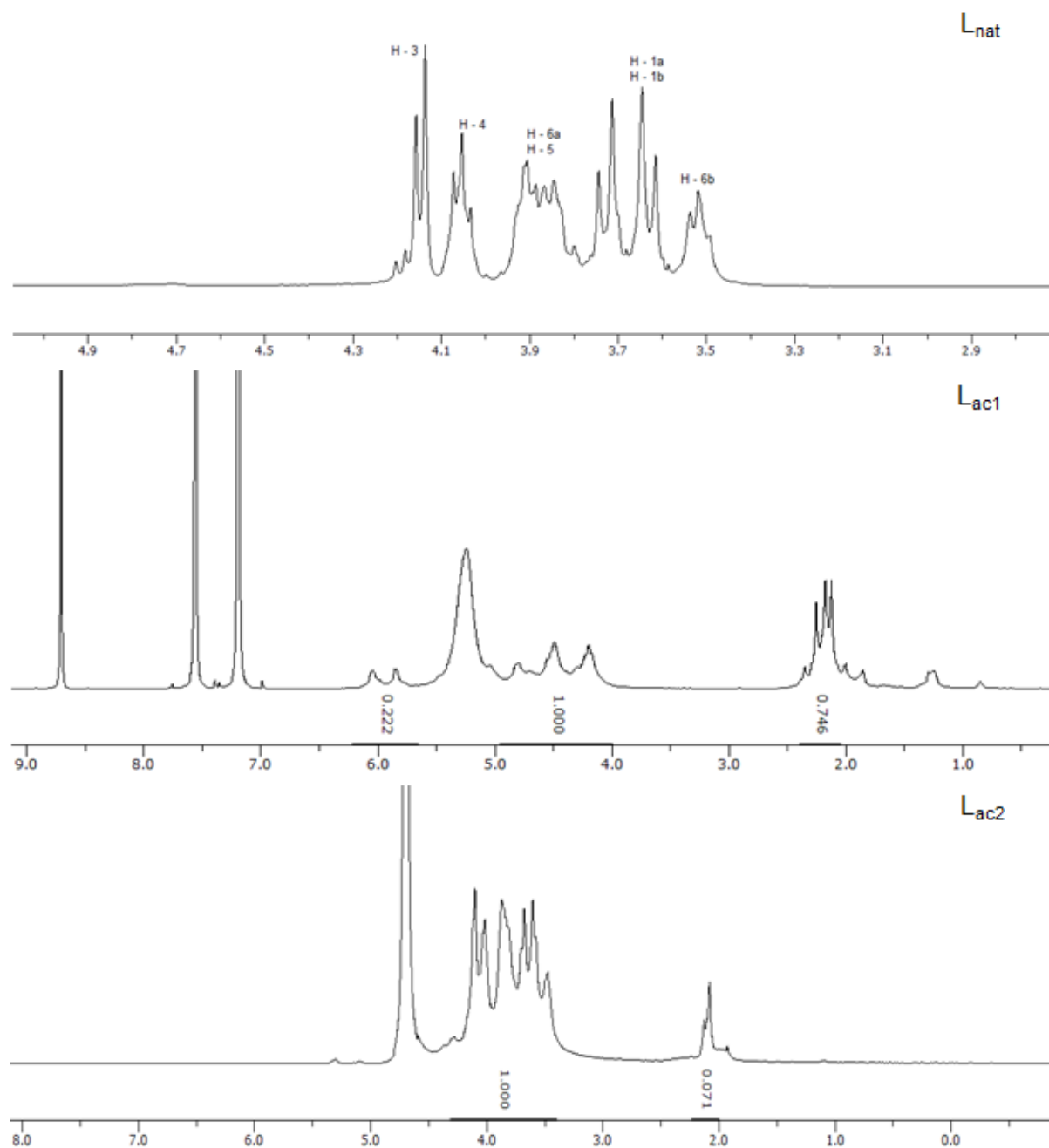
### 3.2. Caracterização da levana por RMN e FT-IR

Após a etapa de produção, a levana nativa e modificada por acetilação foram submetidas às análises de RMN<sup>1</sup>H e FT-IR, que em conjunto, confirmaram a obtenção do produto da reação de modificação, a levana acetilada em dois diferentes graus de acetilação. Como mostra a Fig. 6, os espectros de RMN<sup>1</sup>H da levana indicaram a presença de sete hidrogênios na região entre 3.4 e 4.3 ppm, sinais são referentes às unidades de frutose provenientes da levana (ESAWY et al., 2013). As posições dos hidrogênios carbinólicos foram determinadas com o auxílio dos espectros de HSQC (dados não mostrados), e as correlações diferenciadas por fases distintas para os carbonos primários e secundários apresentaram deslocamentos químicos semelhantes à literatura. Não foram detectados, na região entre 5.1 a 5.3 ppm, sinais referentes aos hidrogênios anoméricos, correspondentes à moléculas de glicose, que poderiam indicar a presença de fruto-oligossacarídeos (DAHECH et al., 2012). Para levana acetilada (L<sub>ac1</sub> e L<sub>ac2</sub>), novos picos surgiram na região em torno de 2.0 ppm, indicando a presença dos grupos metila das acetoxilas. Em L<sub>ac1</sub>, os sinais na região dos hidrogênios carbinólicos (3.4 a 4.3 ppm) sofrem um deslocamento paramagnético devido à desproteção gerada pelo grupo carbonila do éster.

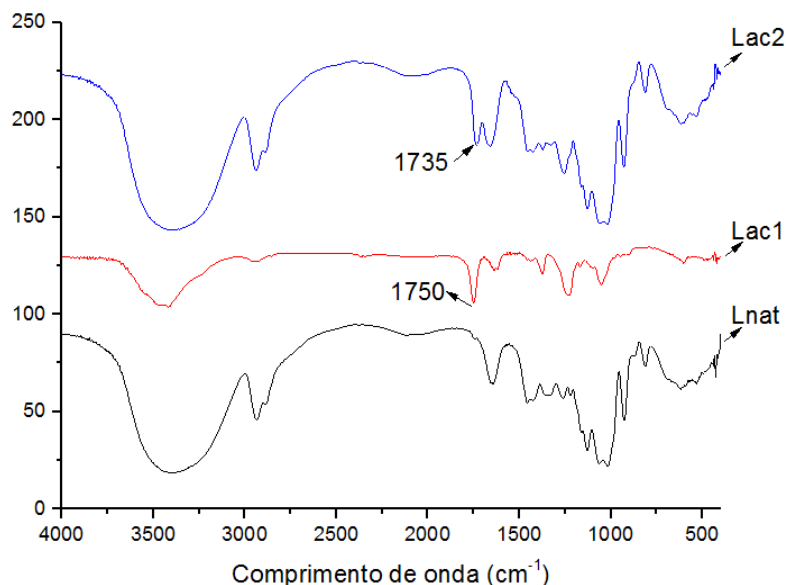
No espectro de FT-IR (Fig. 11), novas absorções foram observadas em 1747 cm<sup>-1</sup> e 1735 cm<sup>-1</sup> em L<sub>ac1</sub> e L<sub>ac2</sub>, respectivamente, representando as vibrações de estiramento das ligações C=O, que confirmam a presença dos grupos acetoxilas. Além de outras absorções que são características da levana nativa, como as vibrações de estiramento das ligações O–H em 3400 cm<sup>-1</sup> e as vibrações de estiramento de C–H observadas em 2950 cm<sup>-1</sup>. A deformação angular de C–H aparece em torno de 1415 cm<sup>-1</sup> e 1340 cm<sup>-1</sup> (SRIKANTH et al., 2015b). E ainda, a região em 1140 cm<sup>-1</sup> e 1115 cm<sup>-1</sup>, que indica as vibrações de estiramento das ligações glicosídicas e a absorção em 930 cm<sup>-1</sup>, atribuída às vibrações de estiramento dos anéis furanosídicos (BARONE; MEDYNETS, 2007).

De acordo com a razão entre o valor de integração dos sinais referentes aos grupos metil das acetoxilas e a integração dos sinais referentes aos hidrogênios carbinólicos da levana nos espectros de RMN<sup>1</sup>H, foi possível calcular o grau de acetilação (%) de L<sub>ac1</sub> (47.3) e L<sub>ac2</sub> (5.5), sendo o rendimento da reação de aproximadamente 30 e 70%, respectivamente. A levana nativa apresenta alta solubilidade em água (BEKERS et al., 2005). Após as modificações, L<sub>ac2</sub> não sofreu alterações visíveis em relação à solubilidade. L<sub>ac1</sub> se tornou insolúvel em água, devido

ao maior grau de acetilação, mas manteve a solubilidade em DMSO. No estudo de Grondahl; Teleman; Gatenholm (2003), este solvente foi considerado o mais apropriado para polissacarídeo com maior grau de acetilação.



**Fig. 6.** Espectros de RMN $^1\text{H}$  da levana ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $L_{\text{ac1}}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) e  $L_{\text{ac2}}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ).



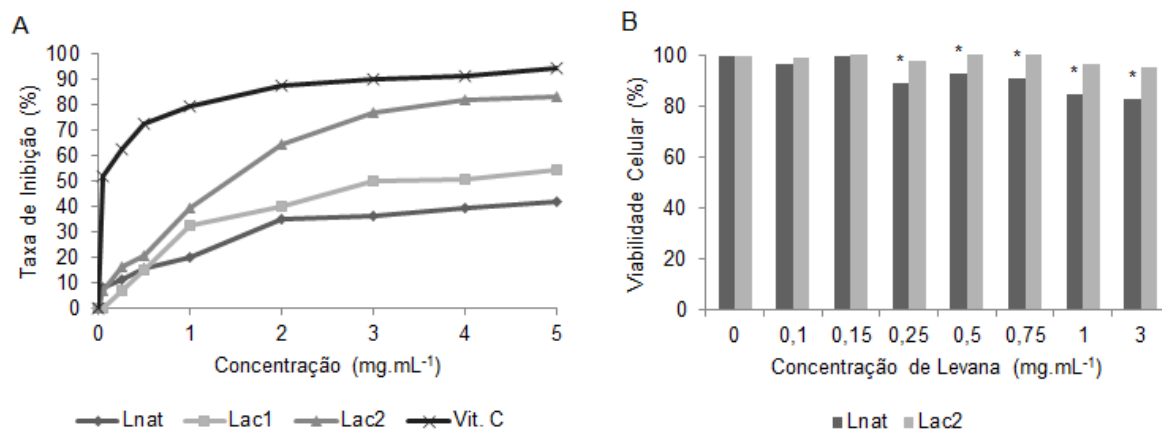
**Fig. 7.** Espectros de FT-IR (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) da levana,  $L_{ac1}$  e  $L_{ac2}$ .

### 3.3. Potencial biomédico da levana nativa e modificada

#### 3.3.1. Atividade antioxidante

O processo de acetilação tem mostrado efeito positivo sobre a atividade biológica de polissacarídeos (CHEN et al., 2013 e CHEN et al., 2014). Assim, a atividade antioxidante, da levana nativa e acetilada, foi testada neste estudo através da capacidade de eliminação (%) dos radicais DPPH. O ensaio para atividade antioxidante (Fig. 8A) mostrou que  $L_{ac1}$  e  $L_{ac2}$  exibiram melhores resultados em relação à levana nativa e que a levana com menor grau de acetilação ( $L_{ac2}$ ) se mostrou mais eficiente.

A taxa de inibição chegou a 42, 54 e 83% em levana,  $L_{ac2}$  e  $L_{ac1}$ , respectivamente. Esses dados são semelhantes aos obtidos por Xie et al. (2015), onde um polissacarídeo acetilado com menor grau de substituição exibiu maior poder de inibição dos radicais DPPH. Tal efeito pode ser atribuído às mudanças químicas, estruturais, conformacionais e da massa molecular, em relação ao polissacarídeo nativo. No estudo de Liu et al. (2012) a levana acetilada foi capaz de exibir maior poder de inibição contra radicais superóxido e hidroxila, em comparação com a nativa, o que indica grande potencial para atividade antioxidante. Outros estudos também relataram que a levana modificada exibe maior atividade antioxidante (ABDEL-FATTAH ET AL., 2012; SARILMISER; ONER, 2014).



**Fig. 8.** Taxa de inibição (%) dos radicais livres DPPH de levana, L<sub>ac1</sub> e L<sub>ac2</sub> (A) e Efeito Citotóxico de levana e L<sub>ac2</sub> sobre células HepG2/C3a (B).

### 3.3.2. Avaliação dos efeitos citotóxicos

Levanas nativas e modificadas têm demonstrado ação antitumoral, que pode ocorrer por ação direta sobre as células tumorais ou indireta, através da ativação de diferentes respostas imunológicas (CHA et al., 2012). No nosso estudo, apenas L<sub>ac2</sub> foi avaliada, devido às limitações de L<sub>ac1</sub> quanto à solubilidade, porém, não apresentou qualquer efeito sobre a viabilidade das células HepG2/C3A. Resultado contrário ao encontrado por Liu et al. (2012), onde as levanas modificadas (0.4 mg.mL<sup>-1</sup>) através de acetilação, fosforilação e benzoilação, exibiram maior taxa de inibição em células tumorais gástricas. No estudo de Abdel-Fattah et al. (2012), a levana sulfatada (0.1 mg.mL<sup>-1</sup>) exibiu alta citotoxicidade seletiva contra células HepG2, levando a apoptose pela via mitocondrial.

A levana nativa foi citotóxica para células HepG2/C3A, a partir da concentração de 0.25 mg.mL<sup>-1</sup>. O tratamento com levana nativa a 3 mg.mL<sup>-1</sup> levou a uma inibição significativa de 17%. Para Calazans et al. (2000) e Yoo et al. (2004) o efeito antitumoral está relacionado com a alta massa molecular da levana. Assim, são necessários mais estudos para determinar as causas da citotoxicidade observada e para explorar as possibilidades de aplicação da levana como agente antitumoral.

## 4. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a aplicação do planejamento fatorial com análise por metodologia de resposta e gradiente de etanol na precipitação permitiram obter levanas com maiores massas moleculares. A levana produzida apresentou duas faixas de massas principais,  $\geq 670$  kDa e  $\leq 50$  kDa. Nas

fermentações em biorreator a MW e a produção de levana foram afetadas pela variação no tempo, aeração e pH. A melhor condição foi encontrada em B2 (0,5 v.v<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, sem controle de pH, 6 h), indicando vantagens na produção em biorreator. levana acetilada em menor grau (5,5%) apresentou maior capacidade de eliminação dos radicais DPPH, e a levana nativa apresentou efeito citotóxico contra células de hepatoma humano (HepG2/C3a). Estes resultados indicam que a levana nativa e acetilada apresentam potencial aplicação biomédica, como agente antitumoral e antioxidante.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro da CAPES. As análises realizadas nos laboratórios multiusuários da UEL: LAMM e SPEC.

### Referências

ABDEL-FATTAH, A. F.; MAHMOUD, D. A.; ESAWY, M. A. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. **Current Microbiology**, v. 51, p. 402 – 407 (2005).

ABDEL-FATTAH, A. M.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; HELMY, W. A.; ESAWY, M. A. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 314– 322, 2012.

AMMAR, Y. B.; MATSUBARA, T.; ITO, K.; IIZUKA, M.; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; MINAMIURA. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus sp.* TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 111-119, 2002.

ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUANASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonasmobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 214-217, 1999.

BARONE, J. R.; MEDYNETS, M. Thermally processed levan polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 554–561, 2007.

BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LAUKEVICS, J.; GRUBE, M.; VIGANTS, A.; LINDE, R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1535-1539, 2005.

BELGHITH, K.; DAHECH, I.; HAMDEN, K.; FEKI, A.; MEJDOUB, H.; BELGHITH, H. Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 1070– 1074, 2012a.

BELGHITH, K.S.; DAHECH, I.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 451- 458, 2012b.

BERTÉ, S.D.; BORSATO, D.; SILVA, P. B.; VIGNOLI, J.A.; CELLIGOI, M.A.P.C. Statistical optimization of levansucrase production from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using response surface methodology. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 898-904, 2013.

BYUN, B. Y.; LEE, S. J.; MAH, J. H. Antipathogenic activity and preservative effect of levan ( $\beta$ -2, 6-fructan), a multifunctional polysaccharide. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p. 238–245, 2014.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R.C.; FRANÇA, F.P.; LOPES, C. E. Molecular Weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, n. 4, p. 245-247, 2000.

CHA, Y.J.; ALAM, N.; LEE, J.S.; LEE, K.R.; SHIM, M.J.; LEE, M.W.; KIM, H.Y.; SHIN, P.G.; CHEONG, J.C.; YOO, Y.B.; LEE, T.S. Anticancer and immunopotentiating activities of crude polysaccharides from *Pleurotus nebrodensis* on mouse sarcoma 180. **Mycobiology**, v. 40, p. 236–243, 2012.

CHEN, S.; CHEN, H.; TIAN, J.; WANG, Y.; XING, L.; WANG, J. Chemical modification, antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 428– 437, 2013.

CHEN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; NIE, S.; LI, C.; XIE, M. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. **Food Chemistry**, v. 156, p. 279–288, 2014.

DAHECH, I.; BELGHITH, K.; HAMDEN, K.; FEKI, A.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 742– 746, 2011.

DAHECH, I.; BELGHITH, K.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 329 - 335, 2012.

DAHECH, I.; HARRABI, B.; HAMDEN, K.; FEKI, A.; MEJDOUB, H.; BELGHITH, H.; BELGHITH, K. Antioxidant effect of nondigestible levan and its impact on cardiovascular disease and atherosclerosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 281– 286, 2013

DAHECH, I.; FAKHFAKH, J.; DAMAK, M.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H.; BELGHITH, K. S. Structural determination and NMR characterization of a bacterial Exopolysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 417– 422, 2013.

DOGSA, I.; BRLOZNIK, M.; STOPAR, D.; MANDIC-MULEC, I. Exopolymer Diversity and the Role of Levan in *Bacillus subtilis* Biofilms. **PLoS One**, v. 8, e62044, 2013.

DONG, C.X.; ZHANG, L.J.; XU, R.; ZHANG, G.; ZHOU, Y. B.; HAN, X. Q.; ZHANG, Y.; SUN, Y. X. Structural characterization and immunostimulating activity of a levan-type fructan from *Curcuma kwangsiensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 99–104, 2015.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C., SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951 – 962, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EL-REFAI, H.A.; ABDEL-FATTAH, A.F.; MOSTAFA, F.A. Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of levansucrase stability by carbohydrate coupling. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 821–827, 2009.

ESAWY, M. A.; AHMED, E. F.; HELMY W. A.; MANSOUR, N. M.; EL-SENOUSY, W. M.; EL-SAFETY, M. M. Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 823-830, 2011.

ESAWY, M. A.; ABDEL-FATTAH, A. M.; ALI, M. M.; HELMY, W. A.; SALAMA, B. M.; TAIE, H. A. A.; HASHEM, A. M.; AWAD, G. E. A. Levansucrase optimization using solid state fermentation and levan biological activities studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 332– 341, 2013a.

ESAWY, M. A.; AMER, H.; GAMAL-ELDEEN, A.; EL ENSHASY, H.; HELMY, W.; ABO-ZEID, M.; MALEK, R.; AHMED, E.; AWAD, G. Scaling up, characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 578– 587, 2013b.

EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 237-243, 1997.

GERHÄUSER, C.; KLIMO, K.; HEISS, E.; NEUMANN, I.; GAMAL-ELDEEN, A.; KNAUFT, J.; FRANK, N. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523, p. 163-172, 2003.

GONÇALVES, B. C. M.; MANTOVAN, J.; RIBEIRO, M. L. L.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* Natto CCT 7712. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 1, p. 01–08, 2013.

GRONDAHL, M.; TELEMAN, A.; GATENHOLM, P. Effect of acetylation on the material properties of glucuronoxylan from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 359–366, 2003.

- LI, M.; SEO, S.; KARBOUNE, S. *Bacillus amyloliquefaciens* levansucrase-catalyzed the synthesis of fructooligosaccharides, oligolevan and levan in maple syrup-based reaction systems. **Carbohydrate Polymers**, v.133, p. 203–212, 2015.
- LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; ZENG, X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 767–772, 2012.
- LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X. In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1278 – 1283, 2010.
- MELO, F. C. B. C.; BORSATO, D.; MACEDO, F. C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan productivity from *Bacillus subtilis* Natto by surface response methodology and its antitumor activity against HepG2 cells using metabolomic approach. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 28, p. 1917–1926, 2015.
- NELSON, N. A. A. Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **The Journal of Biological Biochemistry**, Cincinnati, v.153, p. 375 - 380,1944.
- PORRAS-DOMÍNGUEZ, J.R.; ÁVILA-FERNÁNDEZ, A.; MIRANDA-MOLINA, A.; RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M.E.; MUNGUÍA, A.L. *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 338 – 344, 2015.
- RAGA-CARBAJAL, E.; CARRILLO-NAVA, E.; COSTAS, M.; PORRAS-DOMINGUEZ, J.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; OLVERA, C. Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis*levansucrase. **Glycobiology**, v. 122, p. 1–9, 2015.
- SARILMISER, H. K.; ONER, E. T. Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activatedlevan from *Halomonassmyrnensis* AAD6<sup>T</sup>. **Biochemical Engineering Journal**, v. 92, p. 28–34, 2014.
- SHIH, I-L.; YU, Y-T.; SHIEH, C-J.; HSIE, C-Y. Selective Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8211 – 8215, 2005.
- SILBIR, S.; DAGBAGLI, S.; YEGIN, S.; BAYSAL, T.; GOKSUNGUR, Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 454 – 461, 2014.
- SRIKANTH, R.; SIDDARTHA, G.; REDDY, C. H. S.; HARISH, B. S.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. **Carbohydrate polymers**, v. 123, p. 8 – 16, 2015b.
- SRIKANTH, R.; REDDY, C. H. S.; SIDDARTHA, G.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Review on production, characterization and applications of microbial levan. **Carbohydrate polymers**, v. 120, p. 102–114, 2015a.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. ***Journal Biology Chemistry***, v. 160, p.61 – 68, 1952.

VEGA, R.; ZUNIGA-HANSEN, M. E. A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. ***Biochemical Engineering Journal***, v. 82, p. 158–165, 2014.

XIE, J - H.; ZHANG, F.; WANG, Z – J.; SHEN, M – Y.; NIE, S – P.; XIE, M-Y. Preparation, characterization and antioxidant activities of acetylated polysaccharides from *Cyclocaryapaliurus* leaves. ***Carbohydrate Polymers***, v. 133, 596 – 604, 2015.

ZHANG, Tao; LI, Runjing; QIAN, Haobing; MU, Wanmeng; MIAO, Mu; JIANG, Bo. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus*SK 21.002. ***Carbohydrate Polymers***, v. 95, n. 1, p. 578–587, 2013.

## Apêndice A

### Lista de Figuras (Fig.)

**Fig. 1** - Formação de levana e FOS: a sacarose funciona como doador e acceptor de grupos frutossil, gerando fruto-oligossacarídeos, através da ação da LS. A levana pode ser formada pelo alongamento da 6-Cestose (enzima ataca O<sup>6</sup> da sacarose).

**Fig. 2** - Análise do perfil cromatográfico (A1) e produção e avaliação da massa molecular (A2) do EPS produzido por *B. subtilis* em meio contendo 150 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,5 e recuperado a partir de diferentes proporções de etanol (75, 150 e 300%).

**Fig. 3** - Superfície de resposta dos fatores pH e sacarose na produção de levana de *B. subtilis* natto.

**Fig. 4** - Perfil cromatográfico (A), avaliação da massa molecular (kDa) e produção (B) do EPS obtido por *B. subtilis* em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 h) através das fermentações em biorreator realizadas em diferentes condições (B1, B2 e B3). Os valores acima das barras são referentes ao pH.

**Fig. 5** - Avaliação da atividade enzimática (A1), produtividade de levana (A2), biomassa (A3) e consumo de açúcar (A4) das fermentações realizadas em biorreator (B1, B2 e B3).

**Fig. 6** - Espectros de 1D <sup>1</sup>H RMN de levana (D<sub>2</sub>O), Lac<sub>1</sub> (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) e Lac<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>O).

**Fig. 7** - Espectros de FT-IR (4000 a 400 cm<sup>-1</sup>) de levana, Lac<sub>1</sub> e Lac<sub>2</sub>.

**Fig. 8** - Capacidade de inibição (%) dos radicais livres DPPH da levana nativa e seus derivados acetilados (Lac<sub>1</sub> e Lac<sub>2</sub>) (A). Efeito Citotóxico de levana e Lac<sub>2</sub> sobre células de hepatoma humano (HepG2/C3a) (B).

## Apêndice B

### Lista de Tabelas

**Tabela 1** - Produção de levana por *B. subtilis* natto utilizando delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> para avaliar a influência da concentração de sacarose e pH.

**Tabela 2** – Análise de variância (ANOVA) para produção de levana de *B. subtilis* natto.

## Apêndice C

### Lista de Equações (Eq.)

(Eq. 1): % inibição = ((Abs. do controle – Abs. da amostra) / Abs. do controle) x 100.

(Eq.2): Percentual de Viabilidade Celular = (Absorbância Média de Tratamento / Absorbância Média de Controle) X 100.

(Eq. 3):  $Y = 16.21 + 1.63.X_1 - 1.98.X_1^2 + 1.25.X_2^2 - 1.84.X_2^2 - 1.83.X_1.X_2$

## **5.2. Resultados complementares: Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca e levana de alta massa molecular**

### **5.2.1 Material e Métodos**

#### **5.2.1.1. Material**

O amido de mandioca (Yoki<sup>®</sup> Paranaíba-PR) foi adquirido em um mercado local (Londrina-PR, Brasil) e o glicerol foi adquirido de Synth (São Paulo / Brasil). A levana empregada foi produzida no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, e os cultivos para a produção de levana foram realizados em 4,5 L biorreator (Bio-tec Tecnal – Piracicaba - SP) com 2 L de volume de trabalho, durante 6 h a 37 °C, 150 rpm e pH inicial de 6,5, utilizando uma solução de (g.L<sup>-1</sup>): sacarose 185,0; extrato de levedura 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,0; MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 0,6; MnSO<sub>4</sub>, 0,2 e citrato de amônio, 0,25 (EUZENAT, GUIBERT, COMBES de 1997, modificada).

#### **5.2.1.2 Preparação dos filmes**

Os filmes foram preparados por *casting*, através do preparo de uma solução filmogênica contendo 3 % (m/v) de biopolímeros (amido de mandioca e levana), e a proporção empregada entre amido e levana foi de 100:0; 90:10; 80:20 e 70:30. O glicerol (20 g/100 g biopolímero) foi utilizado como plastificante. As soluções filmogênicas foram aquecidas sob agitação durante 30 min a 70 °C, e as soluções obtidas (30 g) foram vertidas sobre placas de acrílico e a secagem foi realizada em estufa com circulação de ar a 35 °C (aproximadamente 24 h). Os filmes obtidos foram removidos das placas e acondicionados em BOD com 58 % de umidade relativa (UR) e 25 °C até o momento da realização das análises de caracterização.

#### **5.2.1.3 Caracterização dos filmes**

##### **5.2.1.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A análise de microestrutura foi realizada por microscopia eletrônica de varredura - MEV (modelo FEI Quanta 200). Para verificar a estrutura dos filmes, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido e submetidas a um congelamento rápido, depois foram fraturadas com auxílio de uma pinça e secas em estufas por cinco dias a 50 °C. Após estes procedimentos as amostras secas foram revestidas de ouro por um Sputter Coater (BAL-TEC SCD 050) e avaliadas com voltagem de aceleração de 30.0 kV. A análise foi realizada no Laboratório de Microscopia

Eletrônica e de Microanálise (LMEM) da central multiusuária de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

#### **5.2.1.3.2 Microscopia de força atômica**

A análise de microscopia de força atômica foi realizada em microscópio de Força Atômica NanoSurf FlexAFM (Liestal-Suíça) no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da central multiusuária de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina. As análises foram conduzidas em ar e as imagens obtidas em modo contato intermitente. A varredura foi feita na frequência de oscilação livre da haste e com diferentes amplitudes, dependendo da estabilidade e do contraste obtido. O *set point* foi fixado em 30-50% da amplitude de oscilação livre.

#### **5.2.1.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)**

O amido de mandioca nativo, a levana nativa e os filmes produzidos foram analisados por FT-IR, utilizando-se um instrumento Shimadzu FTIR-8400, em uma escala de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , em modo de transmitância. As amostras foram incorporadas ao KBr e submetidas à alta pressão para a produção das pastilhas. A análise foi realizada no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da central multiusuária de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

#### **5.2.1.3.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

Para as análises de DSC, cerca de 10 mg de cada amostra foram colocados em cadinho de alumínio com tampa furada e submetidos a programa de aquecimento controlado. Os ensaios foram realizados no equipamento Netzsch (modelo DSC-204), em uma atmosfera com fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. A faixa de temperatura foi de 0-230 °C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. A análise foi realizada no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da central multiusuária de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

#### **5.2.1.3.5 Difração de Raios-X**

As análises de difração de raios-X (DRX) foram realizadas utilizando um difratômetro (PANalytical X'Pert MPD PRO, Países Baixos) que emite radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). A radiação do ânodo foi gerada a 40 kV e 50 mA e foi

monocromatizada utilizando uma corrente de 20 mA. As medições da intensidade de difração foram realizadas entre  $2\Theta = 2^\circ$  a  $60^\circ$ , a temperatura ambiente.

#### 5.2.1.3.6 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro manual ( $\pm 0,001$  mm) Mitutoyo (São Paulo, Brasil), em quatro pontos diferentes de duas amostras de filmes, considerando-se a espessura do filme como a média entre todas as leituras.

#### 5.2.1.3.7 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A PVA foi determinada gravimetricamente, de acordo com as normas da ASTM E96-00 (2000) com algumas modificações. Cada amostra de filme, em triplicata, foi colocada em uma abertura circular de 60 mm de uma célula de permeabilidade e selada de modo a garantir que a transferência de vapor de água ocorresse exclusivamente através do filme. O conjunto foi colocado em dessecador a  $25^\circ\text{C}$  contendo solução saturada de NaCl que propiciou um ambiente com 75% UR, tendo a célula de permeabilidade que ser parcialmente preenchida com  $\text{CaCl}_2$  de modo a se obter 0% de umidade relativa (UR) no seu interior. Após um período de equilíbrio de 3 horas, as células foram pesadas em intervalos regulares, até a obtenção de uma taxa constante de ganho de peso. O aumento de peso (g) foi registrado e plotado em gráfico em função do tempo (s). O coeficiente angular de cada reta foi calculado pela regressão linear no regime constante ( $r^2 > 0,99$ ) e a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$TPVA = \frac{g}{t} * \frac{e}{A\Delta P}$$

onde:

$g/t$  (gramas/s) = coeficiente angular

$A$  = área de permeação ( $\text{m}^2$ )

$e$  = espessura média dos filmes (m)\*

$\Delta P$  = diferença de pressão de vapor de água (KPa)

#### 5.2.1.3.8 Solubilidade em água

As análises foram realizadas de acordo com o método de Gontard, Guilbert e Cuq (1992) com modificações. As amostras dos filmes foram condicionadas

em UR 58% por 48 h a 25°C antes de serem analisadas. A análise foi realizada em triplicata. As amostras foram secas em estufa com circulação e renovação de ar (Marconi, Brasil) a 60°C por 24 h e pesadas (peso inicial em base seca). Foram então mergulhadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de água destilada, fechados com folha de alumínio e agitados lentamente por 24 h a 25°C em incubadora orbital (Shaker Marconi MA 420). Após este período, as amostras foram removidas e secas em estufa com circulação e renovação de ar (60°C por 24h) para determinar a quantidade do material que não foi solubilizado (peso final). A solubilidade foi expressa pela porcentagem de material seco solubilizado da seguinte forma:

$$\% \text{ MSS} = ((P_f - P_i) / P_f) \times 100$$

Onde MSS é a matéria seca solubilizada,  $P_f$  é o peso final da amostra e  $P_i$  é o peso inicial da amostra, ambos em base seca.

#### **5.2.1.3.9 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas foram analisadas em um texturômetro da marca Brookfield modelo CT3 (Estados Unidos) empregando-se Norma da *American Society for Testing Materials* (ASTM D882-91, 1996). Corpos de prova (50 x 25 mm) foram condicionados sob umidade relativa (UR) de 58% por 48 h a 25 °C. Foram analisados 7 corpos de prova de cada amostra, que foram ajustados às garras de tração do equipamento a uma distância inicial de 50 mm e tracionadas com uma velocidade de 0,8 mm s<sup>-1</sup>. As propriedades determinadas foram resistência máxima à tração na ruptura (MPa) e alongação (%).

#### **5.2.1.4 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o software Statística 7.0 (Statsoft, Oklahoma, EUA).

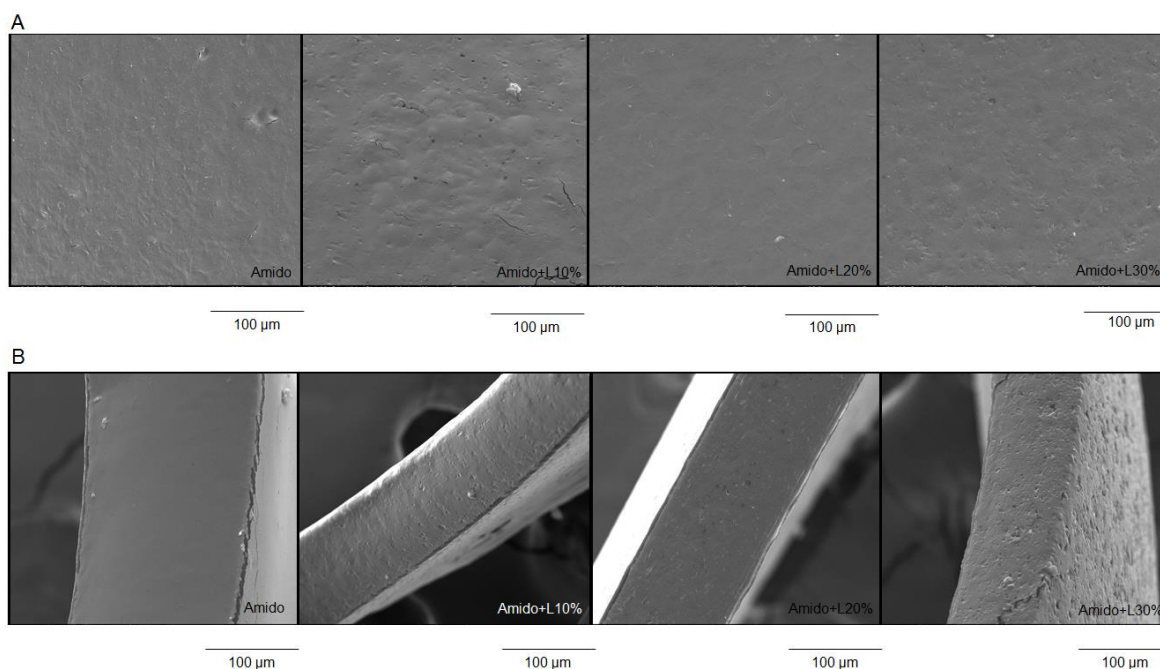
### **5.2.2 Resultados obtidos**

#### **5.2.2.1 Caracterização dos filmes**

##### **5.2.2.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As análises de MEV mostraram homogeneidade nos filmes, indicando que houve boa interação entre a levana e o amido. Nas micrografias das fraturas dos filmes (Figura 13B) pode ser observada uma certa porosidade conforme aumenta-se

a concentração de levana. Segundo Mali et al. (2002) e Mali et al. (2004) os filmes de amido e glicerol produzidos *casting* se apresentam compactos e uniformes. Nas micrografias das superfícies dos filmes (Figura 13A) observa-se que os filmes de amido puro e de amido adicionado de 10% de levana (amido+L10%) apresentam algumas rachaduras, provavelmente devido ao processo de secagem antes das análises. Porém, nos filmes com concentrações maiores de levana (20 e 30%) não foram observadas rachaduras, provavelmente devido às propriedades reológicas da levana, como baixa viscosidade intrínseca ( $\eta = 0,17 \text{ dL g}^{-1}$ ) e alta força de tensão (991 psi), que tornam o polímero muito compacto. Para o microrganismo produtor de levana, esta característica garante tolerância à dessecação (KASAPIS et al., 1994).

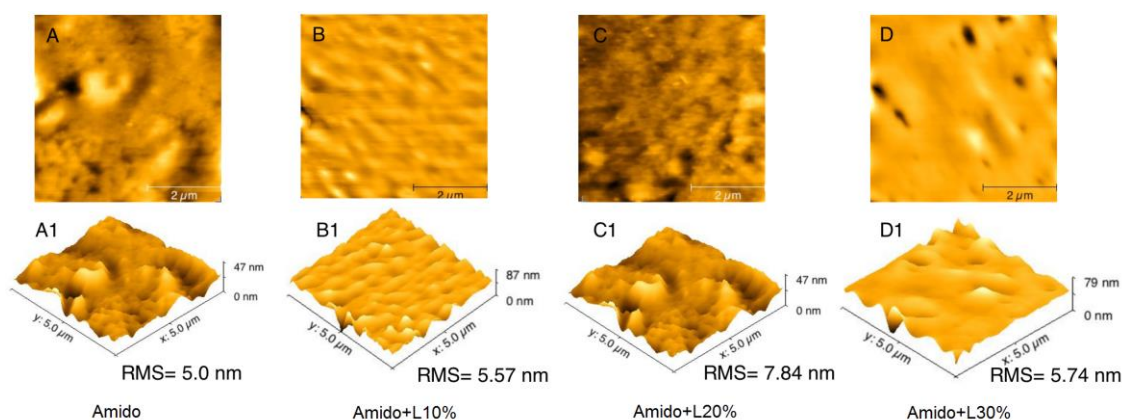


**Figura 13-** Micrografias dos filmes de Amido e Amido+Levana (Amido + L10, 20 e 30%).

#### 5.2.2.1.2 Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) permite a obtenção de imagens topográficas e o cálculo da rugosidade das amostras analisadas. A morfologia dos filmes foi semelhante para todas as formulações (Figura 14), e todos apresentam boa integridade estrutural. A Figura 14 mostra algumas diferenças entre os filmes de amido puro e as misturas de amido e levana. O filme de amido (Figura 14A) apresentou uma superfície lisa com algumas depressões e relevos. As misturas de amido e levana mostraram algumas diferenças de acordo com o percentual de levana acrescentada. A adição de 10% de levana (Figura 14B) não alterou a estrutura da superfície em

comparação com o filme de amido (Figura 14A), e quando a porcentagem de levana foi aumentada para 20%, a superfície se tornou mais irregular (Figura 14C). No entanto, uma matriz muito uniforme foi obtida com 30% de levana na mistura. Estas características morfológicas podem ser claramente vistas em imagens 3D-AFM (Figuras 14 A1, B1, C1). Os valores de rugosidade calculados (RMS) provaram as observações na organização morfológica. A rugosidade no filme de amido, amido com levana 10% e amido com levana 30% amido é semelhante e a observação mais interessante é que, a elevada porcentagem de levana (30%) na mistura deu origem a um filme muito uniforme, com superfície lisa e regular, o que demonstra a compatibilidade e a interação entre os biopolímeros.



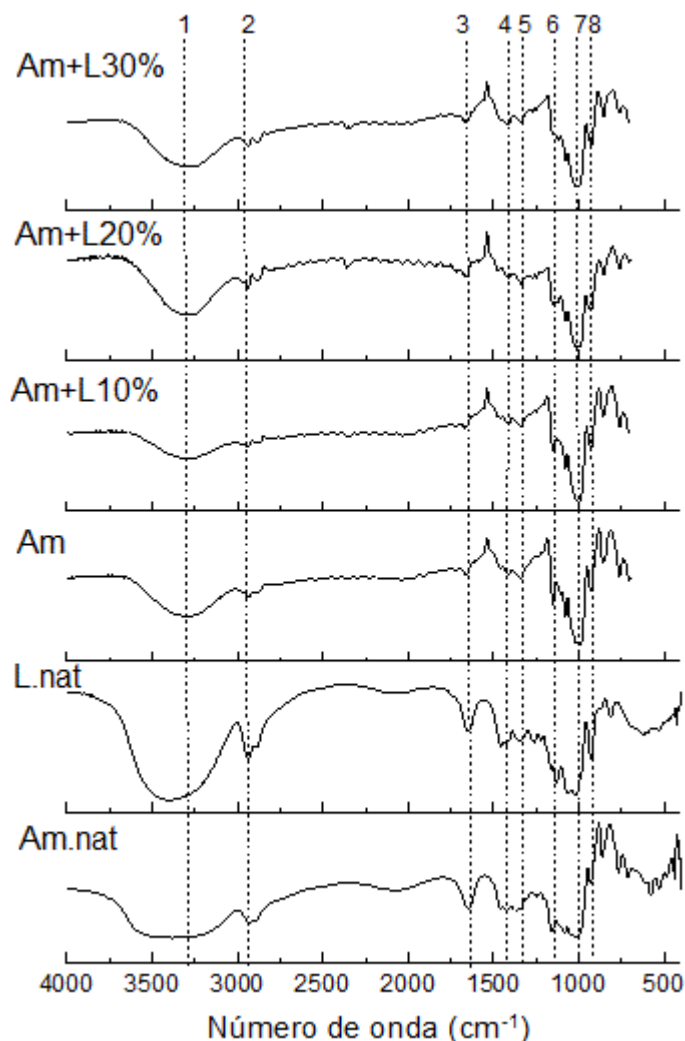
**Figura 14** - AFM dos filmes de Amido (A) e Amido + Levana 10% (B), 20 (C) e 30% (D).

### 5.2.2.1.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros da levana (L.nat) e amido (Am.nat) nativos apresentaram muitas semelhanças (Figura 15), que também puderam ser observadas nos filmes. Todos os espectros mostraram fortes absorções entre  $3300$  e  $3400\text{ cm}^{-1}$  (1), que representam as vibrações de estiramento das ligações O–H, nos filmes esta região sofreu um leve deslocamento em relação aos polissacarídeos nativos, indicando que houve interação entre os materiais. Tal interação também é sugerida pela região em torno de  $1650\text{ cm}^{-1}$  (3), que corresponde à flexão angular das ligações O–H (MALI et al., 2011).

As vibrações de estiramento de C–H podem ser observadas em  $2950\text{ cm}^{-1}$  (2), enquanto a deformação angular aparece em torno de  $1415\text{ cm}^{-1}$  (4) e  $1340\text{ cm}^{-1}$  (5) (SRIKANTH et al., 2015b). A região em  $1140\text{ cm}^{-1}$  (6) indica as vibrações de estiramento das ligações glicosídicas, assim como a região em torno de  $1115\text{ cm}^{-1}$  (7),

que aparece mais acentuada nos filmes, provavelmente devido à adição do glicerol. A banda em  $930\text{ cm}^{-1}$  (8) é atribuída às vibrações de estiramento dos anéis furanosídicos (BARONE; MEDYNETS, 2007).

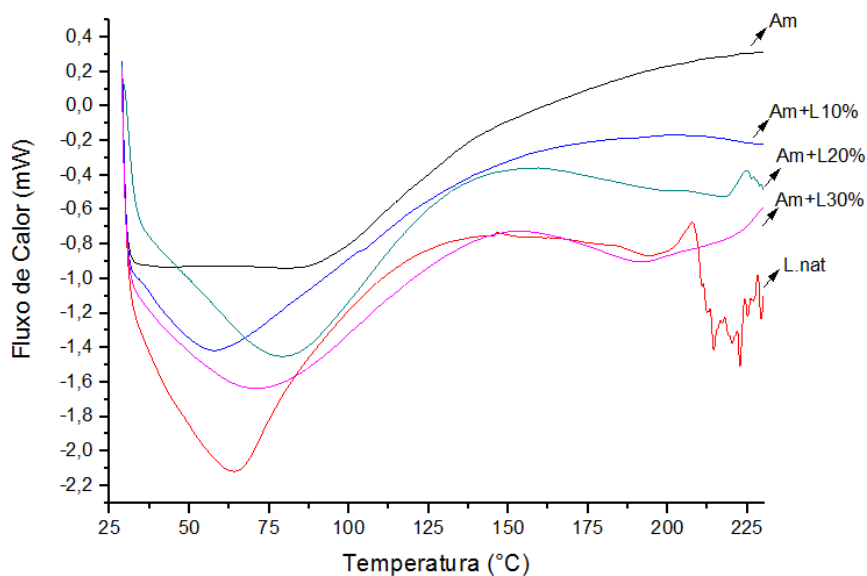


**Figura 15** – Análises de FT-IR das amostras de Amido nativo (Am.nat) e Levana nativa (L.nat) e filmes (Am+L10, 20 e 30%).

#### 5.2.2.1.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Em todas as amostras pode-se observar um pico endotérmico entre  $50$  e  $100^\circ\text{C}$ , possivelmente referente à perda de água nas amostras (Figura 16), para levana nativa (L.nat) e filmes contendo levana, esse pico ocorre em uma temperatura entre  $50$  e  $75^\circ\text{C}$ . O filme de amido apresenta este pico em uma temperatura mais elevada, em  $100^\circ\text{C}$  aproximadamente. A amostra de levana nativa apresentou ainda diversos picos endotérmicos após atingir a temperatura próxima de  $200^\circ\text{C}$ , representando indícios de degradação térmica da levana.

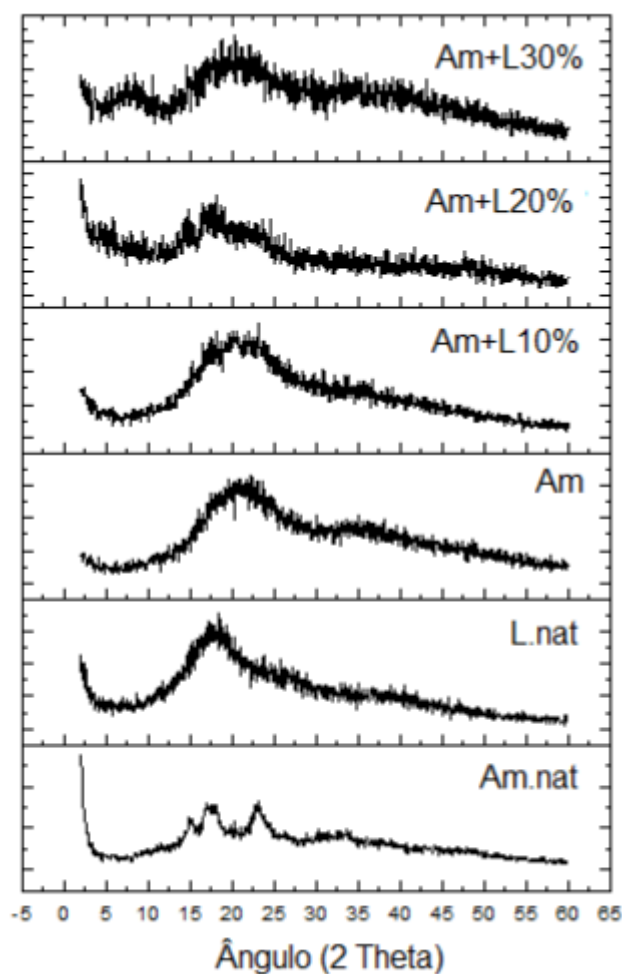
Os filmes de amido e Amido+L10% não apresentaram nenhum pico. O filme Amido+L20% apresentou um pico exotérmico em torno de 225°C e Amido+L30% apresentou um pico endotérmico ente 175 e 200°C.



**Figura 16** – Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) da levana nativa (L.nat) e filmes de amido (Am) e amido+levana (Am+L10, 20 e 30%).

#### 5.2.2.1.5 Difração de Raios-X

Na Figura 17 estão apresentados os difratogramas obtidos para as amostras de amido e levana nativos, e para os filmes produzidos através da mistura de amido e levana. O amido de mandioca apresenta cristalinidade tipo C (combinação do tipo A + B), que pode ser tem picos próximos de  $2\theta = 15,3^\circ$ ;  $17,3^\circ$ ;  $18,3^\circ$ ,  $22$  e  $23,5^\circ$  (Huang et al., 2004). Pode-se observar na Figura 17 a presença destes picos no difratograma referente ao amido de mandioca, e pode-se ainda observar que estes picos desapareceram nos filmes, já que o amido sofreu gelatinização durante o processamento dos mesmos, com conseqüente desestruturação das suas regiões cristalinas. A levana nativa apresenta perfil típico de material amorfo, com um único pico em  $2\theta = 18^\circ$ .



**Figura 17** - Padrões de difração de raios X do amido nativo (Am.nat), levana nativa (L.nat), filme de amido (Am) e filmes de amido/levana (Am+L 10, 20 e 30%).

#### 5.2.2.1.6 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água

Conforme mostra a Tabela 7, os filmes formulados com levana nas diferentes proporções (10, 20 e 30%) apresentaram uma espessura menor que o filme de amido. A permeabilidade ao vapor de água diminuiu significativamente, passando de  $6,66 \times 10^{11}$  (g/msPa) no filme de amido puro para  $4,56 \times 10^{11}$  (g/msPa) no filme com levana a 30% (Tabela 7). A solubilidade aumentou proporcionalmente à adição de levana, havendo diferença estatísticas ( $p \leq 0.05$ ) entre as formulações. De acordo com Bertuzzi et al. (2007), a permeabilidade ao vapor de água depende da solubilidade e do coeficiente de difusão do vapor de água através do filme, e pode-se perceber que embora a solubilidade tenha sido maior nos filmes com adição de levana, a permeabilidade foi menor, e isto é um indicativo de que possivelmente o coeficiente de difusão do vapor de água seja menor nos filmes com a adição da levana.

**Tabela 7** – Espessura, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos com amido (Am) e amido/levana (Am+L 10, 20 e 30%).

Filme	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Solubilidade (%)	PV $\times 10^{11}$ (g/msPa)
Amido	197 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	18,47 $\pm$ 1,07 <sup>d</sup>	6,66 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
Am+L10%	147 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	40,06 $\pm$ 2,02 <sup>c</sup>	4,28 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>
Am+L20%	154 $\pm$ 20 <sup>b</sup>	52,09 $\pm$ 2,82 <sup>b</sup>	4,46 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>
Am+L30%	135 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	79,21 $\pm$ 1,69 <sup>a</sup>	4,56 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>

### 5.2.2.1.7 Propriedades mecânicas

A adição de levana melhorou tanto a resistência do filme, quanto à capacidade de alongação nas três porcentagens testadas, sendo que entre a formulação Amido+Levana20% e Amido+Levana30% não houve diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 8** – Propriedade mecânicas dos filmes de amido (Am) e amido/levana (Am+L 10, 20 e 30%).

Amostras	Resistência Máxima à Tração (MPa)	Elongação (%)
Am	12,15 $\pm$ 1,37 <sup>c</sup>	15,05 $\pm$ 1,22 <sup>c</sup>
Amido+L10%	15,14 $\pm$ 1,56 <sup>b</sup>	18,00 $\pm$ 0,99 <sup>b</sup>
Amido+L20%	18,56 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>	22,16 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>
Amido+L30%	19,24 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	24,07 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>

### 5.2.3 Conclusões

Foi possível incorporar até 30% de levana nos filmes de amido de mandioca, os filmes obtidos quando observados sob microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica mostraram uma estrutura compacta e homogênea, indicativo da boa compatibilidade entre os polímeros usados. Os resultados foram promissores, mostrando que a adição de levana diminuiu a permeabilidade e aumentou a resistência mecânica e alongação dos filmes.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a aplicação do planejamento fatorial com análise por metodologia de resposta e do gradiente de etanol na precipitação permitiram obter EPSs com maiores massas moleculares. A

levana produzida em Erlenmeyer e em biorreator apresentou duas faixas principais de massa molecular,  $\geq 670$  kDa e  $\leq 50$  kDa. Nas fermentações em biorreator a massa molecular e a produção de levana foram afetadas pela variação no tempo, aeração e pH. A produção foi maior em B3, chegando a  $19,3 \text{ g.L}^{-1}$  ( $2 \text{ v.v}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , sem controle de pH), assim como a massa molecular, que apresentou porção de 78,5%  $\geq 670$  kDa após 6 h em F1 ( $0,5 \text{ v.v}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , sem controle de pH), indicando que este pode ser um processo vantajoso. A modificação da levana resultou, com sucesso, na levana acetilada em dois graus, sendo que a levana acetilada em menor grau (5,5%) apresentou maior atividade antioxidante contra os radicais DPPH, no entanto, apenas a levana nativa apresentou efeito citotóxico contra células de hepatoma humano (HepG2/C3a). Estes resultados indicam que a levana nativa e acetilada apresentam potencial aplicação biomédica, como agente antitumoral e antioxidante, respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH, A. F.; MAHMOUD, D. A.; ESAWY, M. A. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. **Current Microbiology**, v. 51, p. 402 – 407 (2005).
- ABDEL-FATTAH, A. M.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; HELMY, W. A.; ESAWY, M. A. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 314– 322, 2012.
- AMMAR, Y. B.; MATSUBARA, T.; ITO, K.; IIZUKA, M.; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; MINAMIURA. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus sp.* TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 111-119, 2002.
- ANANTHALAKSHMY, V.; GUNASEKARAN, P. Overproduction of Levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned sacB gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 109 –115, 1999.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 214-217, 1999.
- ARVIDSON, S. A.; RINEHART, B. T.; GADALA-MARIA, F. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus sp.* **Carbohydrate Polymers**, v.65,p.144–149, 2006.
- BAE, I.Y.; OH, I.K.; LEE, S.; YOO, S.H.; LEE, H.G. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 10–13, 2008.
- BARONE, J. R.; MEDYNETS, M. Thermally processed levan polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 554–561, 2007.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, E.R. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**.3ed. São Paulo: Editora Unicamp, 2007. 480p
- BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LAUKEVICS, J.; GRUBE, M.; VIGANTS, A.; LINDE, R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1535-1539, 2005.
- BELGHITH, KS.; DAHECH, I.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 451- 458, 2012.
- BELGHITH, K.. DAHECH, I.; HAMDEN, K.; FEKI, A.; MEJDOUB, H.; BELGHITH, H. Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 1070– 1074, 2012.

- BERTÉ, S.D.; BORSATO, D.; SILVA, P. B.; VIGNOLI, J.A.; CELLIGOI, M.A.P.C. Statistical optimization of levansucrase production from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using response surface methodology. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 898-904, 2013.
- BERTUZZI, M. A.; CASTRO VIDAURRE, E. F.; ARMADA, M.; GOTTIFREDI, J. C. Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 972–978, 2007.
- BYUN, B. Y.; LEE, S. J.; MAH, J. H. Antipathogenic activity and preservative effect of levan ( $\beta$ -2, 6-fructan), a multifunctional polysaccharide. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p. 238–245, 2014.
- CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R.C.; FRANÇA, F.P.; LOPES, C. E. Molecular Weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, n. 4, p. 245-247, 2000.
- CAZY. Disponível em: <<http://afmb.cnrs-mrs.fr/-cazy/CAZY/index.html>> Acesso em: 3 fev. 2014.
- CHA, Y.J.; ALAM, N.; LEE, J.S.; LEE, K.R.; SHIM, M.J.; LEE, M.W.; KIM, H.Y.; SHIN, P.G.; CHEONG, J.C.; YOO, Y.B.; LEE, T.S. Anticancer and immunopotentiating activities of crude polysaccharides from *Pleurotus nebrodensis* on mouse sarcoma 180. **Mycobiology**, v. 40, p. 236–243, 2012.
- CHEN, X.; XU, X.; ZHANG, L.; ZENG, F. Chain conformation and anti-tumor activities of phosphorylated (1—3)- $\beta$ -D-glucan from *Poria cocos*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 581–587, 2009.
- CHEN, S.; CHEN, H.; TIAN, J.; WANG, Y.; XING, L.; WANG, J. Chemical modification, antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 428– 437, 2013.
- CHEN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; NIE, S.; LI, C.; XIE, M. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. **Food Chemistry**, v. 156, p. 279–288, 2014.
- CHUNG-JEN, C.; JEN-YOU, W.; PO-TING, C.; YUN-PENG, C. Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 3, n. 3, p. 445-451, 2009.
- DAHECH, I.; BELGHITH, K.; HAMDEN, K.; FEKI, A.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 742– 746, 2011.
- DAHECH, I.; BELGHITH, K.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 329 - 335, 2012.
- DAHECH, I.; HARRABI, B.; HAMDEN, K.; FEKI, A.; MEJDOUB, H.; BELGHITH, H.; BELGHITH, K. Antioxidant effect of nondigestible levan and its impact on

cardiovascular disease and atherosclerosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 281– 286, 2013

DAHECH, I.; FAKHFAKH, J.; DAMAK, M.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H.; BELGHITH, K. S. Structural determination and NMR characterization of a bacterial Exopolysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 417– 422, 2013.

DOGSA, I.; BRLOZNIK, M.; STOPAR, D.; MANDIC-MULEC, I. Exopolymer Diversity and the Role of Levan in *Bacillus subtilis* Biofilms. **PLoS One**, v. 8, e62044, 2013.

DONG, C.X.; ZHANG, L.J.; XU, R.; ZHANG, G.; ZHOU, Y. B.; HAN, X. Q.; ZHANG, Y.; SUN, Y. X. Structural characterization and immunostimulating activity of a levan-type fructan from *Curcuma kwangsiensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 99–104, 2015.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C., SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951 – 962, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EL-REFAI, H.A.; ABDEL-FATTAH, A.F.; MOSTAFA, F.A. Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of levansucrase stability by carbohydrate coupling. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 821–827, 2009.

ESAWY, M. A.; MAHMOUD, D. A. R.; FATTAH, A. F. A. Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 237-246, 2008.

ESAWY, M. A.; AHMED, E. F.; HELMY W. A.; MANSOUR, N. M.; EL-SENOUSY, W. M.; EL-SAFETY, M. M. Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 823-830, 2011.

ESAWY, M. A.; ABDEL-FATTAH, A. M.; ALI, M. M.; HELMY, W. A.; SALAMA, B. M.; TAIE, H. A. A.; HASHEM, A. M.; AWAD, G. E. A. Levansucrase optimization using solid state fermentation and levan biological activities studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 332– 341, 2013a.

ESAWY, M. A.; AMER, H.; GAMAL-ELDEEN, A.; EL ENSHASY, H.; HELMY, W.; ABO-ZEID, M.; MALEK, R.; AHMED, E.; AWAD, G. Scaling up, characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 578– 587, 2013b.

EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 237-243, 1997.

GERHÄUSER, C.; KLIMO, K.; HEISS, E.; NEUMANN, I.; GAMAL-ELDEEN, A.; KNAUFT, J.; FRANK, N. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523, p. 163-172, 2003.

GÖKSUNGUR, Y.; UZUNOĞULLARIA, P.; DAĞBAĞLIS, B. Optimization of pullulan production from hydrolysed potato starch waste by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1330–1337, 2011.

GONÇALVES, B. C. M.; MANTOVAN, J.; RIBEIRO, M. L. L.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* Natto CCT 7712. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 1, p. 01–08, 2013.

GUO, Y.; PAN, D.; SUN, Y.; XIN, L.; LI, H.; ZENG, X. Antioxidant activity of phosphorylated exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 849–854, 2013.

GRONDAHL, M.; TELEMAN, A.; GATENHOLM, P. Effect of acetylation on the material properties of glucuronoxylan from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 359–366, 2003.

HUANG, M.F.; YU, J.G.; MA, X.F. Studies on the properties of montmorillonite reinforced thermoplastic starch composites. **Polymer**, v. 45, p. 7017–7023, 2004.

JATHORE, N. R.; BULE, M. V.; TILAY, A. V.; ANNAPURE, U. S. Microbial Levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and Medium Optimization for Enhanced Production. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 1045 – 1053, 2012.

KAN, Y.; CHEN, T.; WU, Y.; WU, J.; WU J. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 151-157, 2015.

KASAPIS, S.; MORRIS, E.R.; GROSS, M.; RUDOLPH, K. Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae*pv. *phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 55–64, 1994.

LI, M.; SEO, S.; KARBOUNE, S. *Bacillus amyloliquefaciens* levansucrase-catalyzed the synthesis of fructooligosaccharides, oligolevan and levan in maple syrup-based reaction systems. **Carbohydrate Polymers**, v.133, p. 203–212, 2015.

LIU, C.; LU, J.; LU, L.; LIU, Y.; WANG, F.; XIAO, M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5528–5533, 2010.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; ZENG, X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 767–772, 2012.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X. In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1278 – 1283, 2010.

MA, H.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, N.; FU, L. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 371 – 378, 2012.

MA, L.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, N.; FU, L. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 371– 378, 2012.

MELO, F. C. B. C.; BORSATO, D.; MACEDO, F. C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan productivity from *Bacillus subtilis* Natto by surface response methodology and its antitumor activity against HepG2 cells using metabolomic approach. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 28, p. 1917–1926, 2015.

MELO, F. C. B. C.; ZAIA, C. T. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Levan from *Bacillus subtilis* natto: its effects in normal and in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1613–1619, 2012.

MIASNIKOV, A. N. Characterization of a novel endo-levanase and its gene from *Bacillus sp.* L7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 154, p. 23-28, 1997.

MURO, A.C. et al. Levan production using mutants strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1639-1642, 2000.

NELSON, N. A. A. Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **The Journal of Biological Biochemistry**, Cincinnati, v.153, p. 375 - 380,1944.

OLIVEIRA, M.R.; da SILVA, R. S.; BUZATO, J.; M.A.P.C. CELLIGOI. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 177–183, 2007.

PAUL, A.; SAMADDAR, N.; DUTTA, D.; BAGCHI, A.; CHAKRAVORTY, S.; CHAKRAVORTY, W.; GACHHUI, R. Mercuric ion stabilizes levansucrase secreted by *Acetobacter nitrogenifigens* strain RG1T. **Protein Journal**, v. 30, p. 262-272, 2011.

POLI, A.; KAZAK, H.; GURLEYENDAG, B.; TOMMONARO, G.; PIERETTI, G.; ONER, E. T.; NICOLAUS, B. High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 651–657, 2009.

PORRAS-DOMÍNGUEZ, J.R.; ÁVILA-FERNÁNDEZ, A.; MIRANDA-MOLINA, A.; RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M.E.; MUNGUÍA, A.L. *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levanmolecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 338 – 344, 2015.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; HU, R.; ZHANG, K.; LI, Z. In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva*

*pertusa* (Chlorophyta). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2441–2445, 2006.

RAGA-CARBAJAL, E.; CARRILLO-NAVA, E.; COSTAS, M.; PORRAS-DOMINGUEZ, J.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; OLVERA, C. Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. **Glycobiology**, v. 122, p. 1–9, 2015.

SANTOS, L.F.; MELO, F.C.B.C.; PAIVA, W.J.M.; BORSATO, D.; SILVA, M. L. C. C.; CELLIGOI, M.A.P. C. Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* NATTO. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, p. 8413 – 8422, 2013.

SANTOS-MORIANO, P.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; POVEDA, A.; JIMENEZ-BARBERO, J.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 119, p. 18–25, 2015.

SARILMISER, H. K.; ONER, E. T. Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6<sup>T</sup>. **Biochemical Engineering Journal**, v. 92, p. 28–34, 2014.

SARILMISER, H. K.; OZDEMIR, G.; ARGAS, K. Y.; ONER, E. T. Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6<sup>T</sup>. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 20, p. 1-9, 2014.

SEIBEL, J.; MORARU, R.; GOTZE, S.; BUCHHOLZ, K.; NA'AMNIEH, S.; PAWLOWSKI, A.; HECHT, H. J. Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* Fructosyltransferase (levansucrase). **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2335-2349, 2006.

SHIH, L.; WANG, T. C.; CHOU, S. Z.; LEE, G. D. Sequential production of two biopolymers-levan and poly- $\epsilon$ -lysine by microbial fermentation. **Bioresource technology**, v. 102, p. 3966–3969, 2011.

SHIH, I-L.; CHEN, L-D.; WU, J-Y. Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 111–117, 2010.

SHI, B. J.; NIE, X. H.; CHEN, L. Z.; LIU, Y.L.; TAO, W. T. Anticancer activities of a chemically sulfated polysaccharide obtained from *Grifola frondosa* and its combination with 5-Fluorouracil against human gastric carcinoma cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 687–692, 2007.

SHIH, I-L.; YU, Y-T.; SHIEH, C-J.; HSIEH, C-Y. Selective Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8211 – 8215, 2005.

SILBIR, S.; DAGBAGLI, S.; YEGIN, S.; BAYSAL, T.; GOKSUNGUR, Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 454–461, 2014.

SRIKANTH, R.; SIDDARTHA, G.; REDDY, C. H. S.; HARISH, B. S.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. **Carbohydrate polymers**, v. 123, p. 8 – 16, 2015 b.

SRIKANTH, R.; REDDY, C. H. S.; SIDDARTHA, G.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Review on production, characterization and applications of microbial levan. **Carbohydrate polymers**, v. 120, p. 102–114, 2015 a.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**, v. 160, p.61 – 68, 1952.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. **Advances in Microbiology and Physiology**, v.8, p.143-213, 1972.

VEGA, R.; ZUNIGA-HANSEN, M. E. A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 158–165, 2014.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, J.; LI, P. Synthesized phosphorylated and aminated derivatives of fucoidan and their potential antioxidant activity in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, p. 170–174, 2009.

XIE, J - H.; ZHANG, F.; WANG, Z – J.; SHEN, M – Y.; NIE, S – P.; XIE, M-Y. Preparation, characterization and antioxidant activities of acetylated polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* leaves. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, 596 – 604, 2015.

YANG, Y.; LIU, D.; WU, J.; CHEN, Y.; WANG, S. In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 1031– 1037, 2011.

ZHANG, Z.; ZHANG, Q.; WANG, J.; SHI, X.; SONG, H.; ZHANG, J. In vitro antioxidant activities of acetylated, phosphorylated and benzoylated derivatives of porphyran extracted from *Porphyra haitanensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 449–453, 2009.

ZHANG, Tao; LI, Runjing; QIAN, Haobing; MU, Wanmeng; MIAO, Mu; JIANG, Bo. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 578–587, 2013.

**ANEXO**

## Anexo A

### Normas para a submissão do artigo para o periódico Carbohydrate Polymers



#### **Carbohydrate Polymers**

ISSN: 0144-8617

Fator de Impacto: 4.074

#### **Preparation**

##### **Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages must be numbered, and lines must be numbered consecutively throughout the manuscript.

##### **Article structure**

(The abstract is not included in section numbering; see specific instructions below.)

### **Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Do not anticipate your results, or provide a chronicle of the works done.

### **Hypotheses**

Nearly all scientific papers benefit from inclusion of a statement of hypothesis. Such statements should be concise, declarative, and should describe the one or more key hypotheses upon which the manuscript is based were intended to confirm or refute. Inclusion of a hypothesis statement makes it simple to contrast the hypothesis with the most relevant previous literature and point out what the authors feel is distinct about the current hypothesis (novelty). It also permits the authors to describe why they feel it would be important to prove the hypothesis correct (significance).

### **Material and methods (or experimental)**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### **Results**

A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Results should be clear and concise.

### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

### **Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. The Conclusion should not be a summary, but should illustrate the advances and claims of innovative aspects of the research work done.

### **Appendices**

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise, attractive and informative. The title should not exceed 120 characters excluding spaces and should make clear the focus of the paper and the

fact that the focus is within the scope of the journal. Specifically name the carbohydrate polymer or group of carbohydrate polymers that is the main focus of the research. Because titles are used in information-retrieval systems, avoid abbreviations and formulae, avoid general terms when specific ones are available, avoid strings of names. Check for syntax and spelling. If your paper is a review paper, please include the word "review" somewhere in the title.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and **the e-mail address of each author**. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department. Institutional email addresses, rather than personal email addresses such as gmail, are strongly preferred for all authors who are affiliated to an institution; this is particularly important for the corresponding author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of reviewing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required, and should be a maximum of 150 words in length. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Numerical values for the most important findings should be reported. An abstract is often presented separately from the article in databases, so it must be able to stand alone. For this reason, vague terms and references should be avoided. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for

example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Chemical compounds**

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164);

Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <https://www.elsevier.com/PubChem>.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field or approved by learned societies in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Abbreviations, except for very common terms (e.g. DNA, NMR), should not be used in the title of the paper.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Formatting of funding sources**

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### **Math formulae**

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g.,  $X/Y$ . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### **Electronic artwork**

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

**Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Do not exceed a total of 8 figures in your research paper.

Carbohydrate Polymers requires authors to include tables and figures in the body of the article at the appropriate position, not at the end of the article.

**References**

**Citation in text**

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication (Smith, 2003);
2. Two authors: both authors' names and the year of publication (Smith & Jones, 2004);

3. Three, four or five authors: all authors names and year of publication (Smith, Jones, & Brown, 2005). For all subsequent citations of this work use et al. (Smith et al., 2005).

4. Six or more authors: first author's name followed by et al. and the year of publication (Black et al., 2007).

Citations may be made directly or parenthetically. Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, b, 1999; Allan & Jones, 1995; Allen et al., 1994). Kramer et al. (2000) have recently shown..."

### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### **References in a special issue**

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### **Reference management software**

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/carbohydrate-polymers>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### **Reference style**

**Text:** Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association.

**List:** references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

**Examples:**

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:<http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary material**

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Data in Brief**

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly

alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, Data in Brief. Please note an open access fee is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found at <http://www.journals.elsevier.com/data-in-brief>. Please use the following template to write your Data in Brief: <https://www.elsevier.com/dib-template>.

### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail addresses for all authors
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Do not contact the editors - they do not have access to this information and will not be able to help you.