



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO CÉSAR BAZANI CABRAL DE MELO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DA LEVANA DE
Bacillus subtilis Natto E SUA APLICAÇÃO COMO AGENTE
ANTICARCINOGÊNICO E HIPOGLICEMIANTE**

FERNANDO CÉSAR BAZANI CABRAL DE MELO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DA LEVANA DE
Bacillus subtilis Natto E SUA APLICAÇÃO COMO AGENTE
ANTICARCINOGENICO E HIPOGLICEMIANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Co-orientador: Dr. Fernando César de Macedo Junior

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C117o Cabral de Melo, Fernando César Bazani.
Otimização da produtividade da levana de *Bacillus subtilis* Natto e sua aplicação
como agente anticarcinogênico e hipoglicemiante / Fernando César Bazani Cabral
de Melo. – Londrina, 2011.
132 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Co-orientador: Fernando César de Macedo Junior.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Microbiologia industrial – Teses. 2. *Bacillus subtilis* – Teses. 3. Hipoglicemia
– Teses. 4. Agentes antineoplásicos – Teses. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine
Colabone. II. Macedo Junior, Fernando César de. III. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
IV. Título.

CDU 663.1

FERNANDO CÉSAR BAZANI CABRAL DE MELO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DA LEVANA DE *Bacillus subtilis*
Natto E SUA APLICAÇÃO COMO AGENTE ANTICARCINOGENICO E
HIPOGLICEMIANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone
Celligoi
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. César Augusto Tischer
UFPR – Paraná - PR

Profa. Dra. Graciette Matioli
UEM – Maringá - PR

Londrina 01 de março de 2011.

À minha mãe, meu pai, meu irmão, minha companheira e o nego. Todos foram importantes em todos os momentos. Um gesto, uma palavra, um carinho, enfim, eles foram os pilares que possibilitaram que eu não esmorecesse ao longo do caminho que trilhei até aqui. Sempre estiveram ao meu lado, nos bons e maus momentos. Se hoje estou aqui e com a perspectiva de um bom futuro, são eles os responsáveis. Que Deus os abençoe a cada dia. Obrigado por tudo. Amo Vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora prof.^a Dra Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi (Tó) por ter me dado a oportunidade e o voto de confiança ao longo dos 5 anos que fiz parte de seus projetos. Exemplo de pessoa e profissional. Obrigado pela paciência, experiência e oportunidades oferecidos ao longo desses anos. É com muito carinho e orgulho que levarei todo ensinamento e amizade adquirida neste tempo que passamos juntos. Muito obrigado por tudo isto Tó!

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esta ao meu lado, me protegendo de todo mau, com muita luz, paz e alegria.

Aos professores do curso que além de mestres são exemplos de vida e companheiros.

Aos amigos que partilharam desta luta ao longo do curso, tanto nos momentos de estresse como nos de lazer.

Ao técnico Nelson Janeiro Rodriguez pela atenção, paciência, dedicação à todos que passaram pelos laboratórios 341 e 343.

Aos funcionários que estão presentes no nosso cotidiano e que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Prof. Dr. Dionísio Borsato por ajudar em toda parte estatística do trabalho.

A Profa. Dra. Cássia Thaís B. Zaia e a todos do laboratório pela paciência e ajuda ao longo dos experimentos.

Ao Departamento de Biologia Geral e Ciências Fisiológicas pela oportunidade e ao Biotério Central pelos animais concedidos.

Ao Prof. Dr. Mario Sérgio Mantovani e ao pessoal do Laboratório de Mutagenicidade e Citotoxicidade pela paciência, auxílio e doação de todo material biológico utilizado ao longo do experimento.

Ao Prof. Dr. Fernando César de Macedo Junior pela co-orientação e por me apresentar a um novo mundo da ciência.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Luiz Cabral que auxiliou na reta final do curso de mestrado.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton por ter cedido sua infraestrutura bem como aos profissionais que lá me ajudaram com muita paciência e compreensão.

A Prof. Simon Buxton por todo background oferecido

A Capes pelo auxílio financeiro ao longo do curso.

Ao programa de Mestrado em Biotecnologia e a Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade única de desenvolver este trabalho.

“Embora ninguém possa voltar e fazer um novo começo, qualquer um pode começar e fazer um novo fim.”

(Chico Xavier)

“O que quer que você faça na vida será insignificante, mas é muito importante que você faça, porque ninguém mais fará.”

(Mahatma Gandhi)

CABRAL DE MELO, Fernando César Bazani. **Otimização da produtividade da levana de *Bacillus subtilis* Natto e sua aplicação como agente anticarcinogênico e hipoglicemiante.** 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011..

RESUMO

A levana é um exopolissacarídeo de frutose formada por ligações β -(2→6) e ramificações β -(2→1) e sintetizada pela enzima levanassacarase. O interesse em seu estudo esta voltado para suas diversas áreas de aplicação, abrangendo as indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética. Muitos microrganismos possuem a capacidade de produzir levana e o *Bacillus subtilis* Natto é uma cepa com grande potencial produtor desse polímero em meio rico em sacarose. O estudo dos fatores que interferem no processo é necessário para otimizar a produção. Buscando a máxima obtenção de levana faz-se uso do planejamento estatístico, que reduz o tempo de laboratório e custo final. Desta forma, este trabalho objetivou avaliar a produtividade de levana de *Bacillus subtilis* Natto por planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta. A levana obtida da condição otimizada foi caracterizada quanto a sua massa molecular por HPSEC-RID-MALLS e foram testadas suas aplicações como agente hipoglicemiante, bem como seu potencial hipocolesterolêmico e hipolipidêmico, em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina; como agente anticarcinogênico, em células hepáticas (HepG2), sendo analisadas por metabolômica auxiliada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Inicialmente foi desenvolvido um delineamento fatorial Box – Behnken 3^3 com as variáveis pH (X_1), temperatura (X_2) e tempo (X_3). Com os resultados desse delineamento um segundo fatorial Box – Behnken (3^3) foi realizado, variando o pH (X_1), a temperatura (X_2) e tempo (X_3). Após ANOVA ($p = 0,05$), a otimização do processo foi realizada e a melhor condição encontrada para a produtividade de levana foi pH 8, temperatura de 39,5 °C e 21 horas, correspondendo a 5,82 g.L⁻¹.h⁻¹. O coeficiente de correlação ($R^2 = 0,81$) foi considerado aceitável para o modelo proposto, atribuindo alta confiabilidade. A levana obtida nesta condição apresentou, após a análise por HPSEC-RID-MALLS, duas massas molares, uma equivalente a 72,37 kDa e outra a 4.146 kDa. Quanto às aplicações esse polímero não apresentou nenhum efeito hipoglicêmico, hipocolesterolêmico e hipolipidêmico, em ratos diabéticos. Porém, em relação à atividade antitumoral, quatro metabólitos tiveram suas concentrações elevadas após estudo do metaboloma das células HepG2, quando foram tratadas com 1 mg.mL⁻¹ de levana, sendo estes: acetato, alanina, fosfocreatina e lactato, levando, possivelmente, a um quadro de hipóxia, promovendo uma quebra de homeostase e conseqüente alterações do metabolismo energético destas células cancerosas, justificando sua ação antitumoral por meio de acúmulo intracelular de lactato.

Palavras chave: Levana. *Bacillus subtilis* Natto. Produtividade. Metaboloma. Hipoglicêmico. Antitumoral.

CABRAL DE MELO, Fernando César Bazani. **Optimization of levan productivity of *Bacillus subtilis* Natto and its application as anticarcinogenic and hypoglycemic agent.** 2011. 132 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Levan is an exopolysaccharide of fructose formed by the linkage of β -(2 \rightarrow 6) and ramifications β -(2 \rightarrow 1), synthesized by levansucrase. Due to its chemical properties levan presents applications in pharmaceutical, food and cosmetics industries. *Bacillus subtilis* Natto has been outstanding recently, as levan producer, due its capacity to produce high amounts of this polymer in medium containing sucrose, becoming a promising industrial producer. Therefore, it is necessary optimize the variables involved in the process, in order to obtain a highest levan productivity, for that, the statistical planning is an important tool, decreasing costs and time in the end of the process. Taking into account, this work aiming to evaluate the productivity of levan from *Bacillus subtilis* Natto by factorial design and response surface methodology, characterizes its molecular weight by HPSEC-RID-MALLS, thus analyze its applications as hypoglycemic agent, as well its hypocholesterolemic and hypolipidemic effects, in diabetics rats induced by streptozotocin; and its antitumoral activity against HepG2 cells by metabolomics using hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H – NMR). Initially, it was developed a factorial design (3^3) Box – Behnken varying pH (X_1), temperature (X_2) and culture time (X_3). Based on this preliminary design, a second (3^3) Box – Behnken was performed, once more pH (X_1), temperature (X_2) and culture time (X_3) were varied. After ANOVA ($p = 0,05$), the results demonstrated that the levan productivity was optimized and the best condition found was at pH 8, 39.5 °C in 21 hours, corresponding to 5,82 g.L $^{-1}$.h $^{-1}$. The coefficient of correlation ($R^2 = 0,81$) was considerate acceptable, attributing a high confidence to the model. Thus, the levan obtained in this optimized condition presented two different molecular weights corresponding to 72,37 kDa and 4146 kDa, analyzed by HPSEC-RID-MALLS. Regarding applications, levan did not presented hypoglycemic, hypolipidemic and hypocholesterolemic effects in diabetic rats. However, the antitumoral activity of levan increased four metabolites concentration, after metabolomics analyzes of HepG2 cell line when treated with 1 mg.mL $^{-1}$ of levan. The metabolites altered are acetate, alanine, phosphocreatine and lactate, possibly leading to a hypoxia environment, promoting homeostasis dysregulation following by alterations in HepG2 energy metabolism, justifying levan antitumor activity by high intracellular lactate accumulation.

Key words: Levan. *Bacillus subtilis* Natto. Productivity. Metabolomics. Hypoglycemic. Antitumoral.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Percentagens das ligações glicosídicas e seus tipos, analisadas da levana produzida por <i>Bacillus polymyxa</i>	21
Tabela 2 – Meio de preservação para <i>Bacillus subtilis</i>	41
Tabela 3 – Meio de inóculo (CALAZANS et al., 2000)	42
Tabela 4 – Meio de fermentação (EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997, modificado).....	42
Tabela 5 – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Formulation (Sigma Aldrich, Inc.), para cultivo da cultura de tecidos	43
Tabela 6 – Delineamento fatorial Box – Benhken (3^3) para avaliar os efeitos do pH, temperatura e tempo na produtividade de levana (Y_1) de <i>Bacillus subtilis</i> Natto em 300 g.L ⁻¹ de sacarose a 100 rpm	45
Tabela 7 – Segundo delineamento fatorial Box – Benhken (3^3) para a máxima produtividade de levana (Y_1) por <i>Bacillus subtilis</i> Natto em 300 g.L ⁻¹ de sacarose a 100 r.p.m.....	46

Anexo A

Tabela 1 – Delineamento fatorial Box – Benhken (3^3) para avaliar os efeitos do pH, temperatura e tempo na produtividade de levana (Y_1) de <i>Bacillus subtilis</i> Natto em 300 g.L ⁻¹ de sacarose a 100 rpm.....	77
Tabela 2 – Segundo delineamento fatorial Box – Benhken (3^3) para a máxima produtividade de levana (Y_1) por <i>Bacillus subtilis</i> Natto em 300 g.L ⁻¹ de sacarose a 100 rpm.....	78

Anexo B

Tabela 1 – Concentração plasmática de glicose, colesterol total e triacilglicerol em ratos normais (N), normais com levana (N+Lev), diabéticos (D) e diabéticos com levana (D+Lev), após 15 dias de tratamento	103
---	-----

Tabela 2 – Ganho médio de peso corpóreo ($\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$), consumo médio de ração (gramas por 100 g de peso corpóreo, por dia) e eficiência de conservação de alimento de ratos normais (N), normais com levana (N+Lev), diabéticos (D) e diabéticos com levana (D+Lev), após a indução do diabetes e ao longo dos 15 dias de experimento.....104

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura química da molécula de levana de *Streptococcus salivarius* SS2 , formada por ligações β -(2 \rightarrow 6) na cadeia principal e ramificações β -(2 \rightarrow 1) (SIMMS, BOYKO, EDWARDS 1990).....21
- Figura 2** – Reação de hidrólise da sacarose e polimerização dos resíduos de frutose pela enzima levanasacarase23
- Artigo A**
- Figura 1** – Superfície de resposta da produtividade de levana para a temperatura (X_2) e tempo (X_3) em pH (X_1) fixado em 8 após a otimização do processo..... 84
- Figura 2** – Cromatogramas da levana de *Bacillus subtilis* Natto obtidos da melhor condição de cultivo (pH 8, 39,5°C; 21 horas), analisado por Cromatografia de Exclusão Molecular de Alta Performance (HPSEC). Em A) amostra detectada pelo detector de dispersão de luz multi – angular (MALLS); em B) amostra detectada pelo detector de índice de refração (RID) 86
- Figura 3** – Espectro referente às dispersões químicas compreendidas entre (1 e 2 ppm) e (3 e 4.2 ppm) onde foi encontrado variação na concentração dos metabólitos produzidos pelas células HepG2 na ausência (vermelho) e presença (preto) de levana após análise por $^1\text{H-NMR}$ em 500 MHz, pH 7 e 25 °C. As setas apontam para os picos correspondentes a dispersão química dos metabólitos acetato, alanina, fosfocreatina e lactato 89

LISTA DE ABREVIACÃO E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AR	Açúcares Redutores
AT	Açúcares Totais
ATP	Adenosina Trifosfato
COX-2	Ciclooxigenase-2
CSP-1	Cordyceps sinensis polissacarídeo 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EPS	Exopolissacarídeos
FOS	Frutoligosacáridos
GRAS	Generally Regarded as Safe
GTM	Ganoderma tsugae mycelium
HDL	High-density lipoprotein
HepG2	Carcinoma Hepatocellular
HPSEC	High Performance Size Exclusion Chromatography
HIF-1	Fator de Indução de Hipóxia 1
LBP-1	Lycium barbarum polissacarídeo 1
LDL	Low Density Lipoprotein
LEV	Levana
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncroton
LPS	Lipopolissacarídeo
LSP -1	Liriope spicata polissacarídeo 1
MALLS	Multiple Angle Laser Light Scattering Detector
MCF-7	Câncer de Mama Humano
MTC4	Transportador Monocarboxilato 4
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDK	Piruvato Desidrogenase Quinase
PPSB	Heteropolissacarídeo Ácido
RID	Refraction Index Detector
ROS	Reactive oxygen species

SGC7901	Câncer Gástrico Humano
SNU-1	Carcinoma Estomacal Humano
STZ	Estreptozotocina
TCA	Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos
TSP	Tampão d4 – Trimetilsililpropionato de Sódio
VEGS	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO LITERÁRIA	19
2.1	LEVANA	19
2.1.1	Levanasacarase	23
2.1.2	Produção de Levana	25
2.1.3	Aplicações	28
2.1.3.1	Atividade Antitumoral	30
2.1.3.2	Atividade Hipoglicêmica e Hipocolesterolêmica	31
2.2	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE LEVANA	34
2.2.1	Bacillus Subtilis Natto	35
2.3	METABOLÔMA	36
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	MATERIAL	41
4.1.1	Microrganismo	41
4.1.2	Meios de Cultura	41
4.1.2.1	Meio de preservação	41
4.1.2.2	Meio de inóculo	42
4.1.2.3	Meio de fermentação	42
4.1.2.4	Meio de cultura de células tumorais	43
4.2	MÉTODOS	43
4.2.1	Preservação do Microrganismo	43
4.2.2	Planejamento Estatístico	44
4.2.3	Processo Fermentativo	47
4.2.3.1	Inóculo	47
4.2.3.2	Fermentações	47

4.2.4	Métodos Analíticos.....	48
4.2.4.1	Determinação dos açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT) das fermentações	48
4.2.4.2	Quantificação da levana	48
4.2.4.3	Determinação da massa molar e homogeneidade da levana por cromatografia de exclusão molecular de alta performance.....	49
4.2.5	Análise Estatística.....	49
4.2.6	Fermentação em Escala Maior.....	49
4.2.7	Análise da Atividade Hipoglicemiante da Levana.....	50
4.2.7.1	Preparo da solução.....	50
4.2.7.2	Protocolo experimental para análise de atividade hipoglicemiante.....	50
4.2.8	Análise Metabolômica da Atividade Antitumoral da Levana por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹ H-RMN).....	51
4.2.8.1	Cultura celular.....	51
4.2.8.2	Extração dos metabólitos celulares.....	52
4.2.8.3	Experimentos de RMN.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	ANEXOS	72
	ANEXO A: ARTIGO A – ESTUDO DA PRODUTIVIDADE DA LEVANA DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> NATTO POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL CONTRA CÉLULAS HEPG2 USANDO ABORDAGEM METABOLÔMICA.....	73
	ANEXO B: ARTIGO B – INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA LEVANA DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> NATTO COMO POSSÍVEL AGENTE HIPOGLICEMIANTE EM RATOS DIABETOGENICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCIN.....	96
	ANEXO C	111
	ANEXO D	128

1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros encontrados na natureza, produzidos por uma série de organismos e microrganismos, dentre estes se destacam os fungos, leveduras e bactérias. Atualmente, o estudo destes compostos está em evidência, uma vez que, suas funcionalidades físicas e fisiológicas favorecem sua aplicação em inúmeras áreas industriais.

A levana é um desses exopolissacarídeos de importância biológica constituído de unidades de frutose unidas por ligações do tipo β -(2 \rightarrow 6) e ramificações β -(2 \rightarrow 1), formada pela enzima (E.C. 2.4.1.10) levanasacarase, que hidrolisa a sacarose em meio com concentrações elevadas de açúcares e polimeriza a frutose em levana.

Muitos microrganismos são capazes de sintetizar a levana, dentre eles, o *Bacillus subtilis* Natto que tem demonstrado grande potencial nessa produção. É uma cepa pouco estudada tanto na produção como na aplicação de levana, sendo assim, se torna alternativa, uma vez que é um microrganismo isolado do Natto, um alimento japonês descrito como promotor de benefícios à saúde humana e não patogênico.

A produção de levana e suas características - massa molar, ramificação, quantidade produzida – podem ser alteradas pelo microrganismo utilizado, bem como pela composição do meio e condições de cultivo. Portanto, se faz necessário definir as variáveis, que possam melhorar a produtividade e as características da levana. Para estudar as diferentes variáveis o uso do planejamento estatístico, que integra os diferentes fatores, podem reduzir o número de experimentos e melhorar a qualidade dos resultados alcançando a máxima produtividade.

Considerando as áreas de aplicação da levana, destaca-se a indústria médica e farmacêutica, nas quais o polímero pode ser utilizado como agente hipoglicemiante, hipocolesterolêmico, anticarcinogênico, substituto do plasma sanguíneo, imunomodulador, imunoestimulador, antialergênico, prolongador do efeito de certas drogas e agente anti-citotóxico. Com relação a indústria de alimentos, a levana vem sendo aplicada como substituta da dextrana e goma arábica, espessante, carreador de sabor e fragrâncias, adoçante, estabilizante, fonte

de frutose, película de revestimento e ainda observa-se, também, sua aplicação na fabricação de produtos dietéticos e probióticos. Por fim, existem algumas patentes utilizando a levana na indústria de cosméticos como sabonete de limpeza facial, no tratamento de rugas, peles secas, sardas, manchas e queimaduras de sol.

Dentro da área farmacêutica, se destaca o uso da levana como um agente promissor para reduzir a diabetes, que segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em todo o mundo, o número de pessoas com diabetes no ano de 2000 era de 171 milhões e a previsão para o ano de 2030 é de 366 milhões. De acordo com o "Relatório Mundial do Câncer 2008", publicado pela Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer, a incidência de câncer em todo o mundo deve dar um salto de 11,3 milhões em 2007 para 15,5 milhões em 2030 (World Health Organization, 2008), tornando necessário também o desenvolvimento de novas tecnologias que promovam a diminuição destes índices.

Assim sendo, para verificar a aplicação da levana ainda na área farmacêutica, como agente anticarcinogênico, o uso de células e tecido é uma linha de estudos, que evita testes preliminares com animais e seres humanos, e as análises dos efeitos produzidos pelo EPS, podem ser verificados pelo estudo do metaboloma. Este método consiste em analisar os metabólitos produzidos em nível celular, quantitativamente e qualitativamente, fazendo a conexão entre o genótipo e o fenótipo do organismo, e verificando o efeito da nova substância no metabolismo celular. Uma vez que além da obtenção do novo composto com propriedades farmacêuticas é importante também entender como é sua ação no organismo. Para auxiliar esta nova forma de estudo, a ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$) está em evidência, uma vez que propicia a análise de pequenas concentrações de metabólitos intracelulares, gerando uma nova área de atuação científica, a metabolômica, que comprova os efeitos de novos produtos.

Considerando que a levana é um exopolissacarídeo com propriedades promissoras na aplicação para a saúde humana, este trabalho focou estudar, com auxílio da metodologia estatística, o aumento da produtividade da levana por *B. subtilis* Natto, variando as condições de cultivo, bem como avaliar as características deste polímero, seus possíveis efeitos sobre o metabolismo de células cancerígenas e sua ação como agente hipoglicêmico e hipocolesterolêmico.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 LEVANA

Os exopolissacarídeos são biopolímeros encontrados na natureza produzidos por diversos microrganismos e organismos. Destacam-se entre estes as bactérias, fungos e leveduras (LAWS; GU; MARSHALL, 2001; SAUDE; JUNTER, 2002). Selbmann et al. (2002) afirmam que os EPS podem ser considerados uma forma de adaptação evolutiva bem sucedida, pois quando em ambientes com condições extremas, os EPS possibilitam a sobrevivência de inúmeros microrganismos.

A utilização e o estudo destes compostos vem crescendo ultimamente, sendo que os principais motivos são, alto valor agregado, inúmeras aplicações em diversas áreas industriais e por se tratar de um produto de origem natural. Segundo Boels et al. (2001) eles podem ser divididos em 3 classes: lipopolissacarídeos, constituintes da parede celular; polissacarídeos capsulares, associados a superfície celular e os exopolissacarídeos, que são secretados pelo microrganismo, fazendo parte do metabolismo primário.

Os EPSs podem ser classificados em dois grupos, baseados em sua composição. Aqueles que são formados por um único tipo de monossacarídeo, são os homopolissacarídeos, os que são formados por mais de um, são os heteropolissacarídeos (van HIJUM et al., 2006).

As funções atribuídas aos EPSs em seu ambiente natural estão associadas a diversos processos, como: adesão, proteção, reserva energética, reconhecimento e formação de colônias, entre outros, auxiliando na adaptação ao ambiente do microrganismo e organismos produtores (ROBERTS, 1996; EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997; LOOIJESTEIJN et al., 2001; MURALIDHARAN; JAYACHANDRAN, 2003; KHALIKOVA; SUSI; KORPELA, 2005; MUÑOZ-GUTIÉRREZ; RODRIGUEZ-ALEGRÍA; MUNGUÍA, 2009).

Os exopolissacarídeos produzidos por microrganismos podem ser iônicos e não iônicos quando em solução aquosa, formar ligações glicosídicas ramificadas ou não, possibilitando uma diversidade no espectro biológico, variando

suas propriedades químicas e físicas, o que acarreta em inúmeras aplicações nas indústrias de alimento, farmacêutica, química, cosmético e outras (SUTHERLAND, 1998; FUSCONI et al., 2010).

Dentre estes exopolissacarídeos é possível destacar estudos recentes de: curdulana (McINTOSH; STONE; STANISICH, 2005); alginato (REMMINGHORST; REHM, 2006); gelana (BANIK; SANTHIAGU; UPADHYAY, 2007); xantana (HAMCERENCU et al., 2007) emulsana e pululana (SINGH; GAGANPREET; KENNEDY, 2008), celulose (BARUD et al., 2008; LEGNANI et al., 2008); dextrana (KATINA et al., 2009), etc.

Entre esses EPSs, a levana é um dos homopolímeros de frutose, mais importantes encontrados na natureza. Pode ser produzida tanto por vegetais como por microrganismos (ARVIDSON; RINEHART; GADALA-MARIA, 2006).

Os primeiros pesquisadores que identificaram o exopolissacarídeo e o denominaram de levana foram Greig – Smith, em 1901. Eles observaram que em soluções contendo sacarose, caldo-de-cana, 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.

A partir de então, uma série de estudos foram realizados sobre essa nova goma. Hibbert e Tipson, em 1930, descreveram a estrutura da goma levana, utilizando o *Bacillus mesentericus* como produtor e o caldo de cana-de-açúcar como fonte de sacarose e concluíram que a levana possuía uma cadeia principal formada por resíduos frutofuranosídeos, que eram polimerizados, em ligações β -(2→6).

Em 1990, Simms, Boyko e Edwards determinaram a estrutura da levana produzida por *Streptococcus salivarius* SS2 e concluíram que esta é constituída por uma cadeia principal de resíduos de β -D-frutofuranosídeos ligados por ligações β -(2→6) e ramificações com ligações β -(2→1) demonstradas na Figura 1.

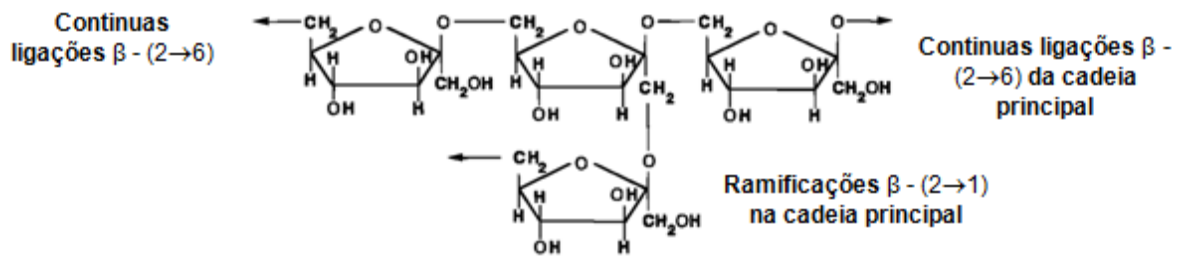


Figura 1 – Estrutura química da molécula de levana de *Streptococcus salivarius* SS2 , formada por ligações β -(2 \rightarrow 6) na cadeia principal e ramificações β -(2 \rightarrow 1) **Fonte:** Simms, Boyko e Edwards (1990).

Han e Clarke (1990) constataram a mesma estrutura, reforçando as informações já publicadas. A levana produzida por *Bacillus polymyxa* foi analisada por espectroscopia de massa, ressonância magnética nuclear de ^{13}C , cromatografia líquida de alta eficiência e análise por metilação, gerando um resultado que demonstrava um polímero composto por 98% de unidades frutofuranosídicas. Estes compostos estavam ligados entre si por ligações glicosídicas com diferentes proporções do tipo de ligação como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Percentagens das ligações glicosídicas e seus tipos, analisadas da levana produzida por *Bacillus polymyxa*.

Tipo de ligação	%
Cadeia principal β -(2-6)	71
Ramificações -C1, C2 e C6	12
Grupos terminais -C1 e C2	13
Hexoses livres	4

Fonte: Han e Clarke (1990).

Recentemente, Yoo et al. (2004), analisando a composição de açúcares da levana de *Gluconoacetobacter xylinus*, *Microbacterium laevaniformans*, *Rahnella aquatilis* e *Zymomonas mobilis* por HPLC, identificaram como único constituinte da molécula monômeros de frutose, porém, a molécula pode sofrer variações dependendo do microrganismo e das condições de cultivo. Ainda, no mesmo trabalho, por meio de metilação e análise por cromatografia gasosa e

espectrofotometria de massa, eles confirmaram a estrutura química da levana, sendo que os resíduos de frutose são unidos por ligações do tipo β -(2 \rightarrow 6), formando a cadeia principal da levana e ramificações β -(2 \rightarrow 1). Utilizando também *Microbacterium laevaniformans*, Oh et al. (2004), chegaram nas mesmas conclusões, porém para determinar a estrutura química eles fizeram uso da ressonância magnética nuclear (^{13}C - NMR), confirmando desta forma a composição e forma estrutural da levana.

A levana é um polissacarídeo não usual, uma vez que diferentemente de outras moléculas de massa molar semelhante, apresenta uma baixa viscosidade intrínseca que, aliado a alta massa molar, favorece uma forma esférica (ARVIDSON; RINEHART; GADALA-MARIA, 2006). Newbrun, Lacy e Christie (1971) demonstraram com microscopia eletrônica uma levana de forma elipsóide, e mais recentemente Rhee et al. (2002) sugeriram que as ramificações são radiais e formadas em uma taxa constante. Por se tratar de uma estrutura furanosídica, a levana apresenta uma flexibilidade maior em comparação aos polímeros formados por anéis de piranose (HAN, 1990).

A levana é um composto levorrotatório com regiões amorfo e cristalinas e solubilidades diferentes em água gelada, alta solubilidade em água quente e insolúvel em álcool (HAN, 1990).

Devido a sua estrutura, as levanas produzidas por vegetais apresentam menor massa molar menor que 40 kDa (RHEE et al., 2002), enquanto que as produzidas por microrganismos possuem maior massa molar superiores a 40 kDa e muitas ramificações (KEITH et al., 1991).

Geralmente as levanas produzidas por diferentes seres vivos apresentam estrutura similar, variando apenas no grau de polimerização e ramificação, que por sua vez, são pequenas, consistindo até mesmo de apenas uma molécula de frutose (HAN, 1990).

Segundo Arvidson, Rinehart e Maria-Gadala (2006) a viscosidade encontrada para levana foi de $0,14 \text{ dL.g}^{-1}$. Por outro lado, Bae et al. (2008), encontraram uma levana com viscosidade igual a $0,38 \text{ dL.g}^{-1}$, ambos autores atribuem a diferença aos diferentes microrganismos produtores, uma vez que o grau de ramificação é alterado inter e intra espécies.

2.1.1 Levanasacarase

A produção de levana bacteriana ocorre exclusivamente pela ação de uma enzima extracelular (MENG; FÜTTERER, 2003), classificada como transferase (E.C. 2.4.1.10 – Sacarose-2,6-β-D-Frutana2,6-β-D-Frutosiltransferase) denominada de levanasacarase. De acordo com a classificação encontrada na database carbohydrate active enzymes (CANTAREL et al., 2009), a levanasacarase bacteriana é classificada na família de hidrolases glicosídicas 68 (GH).

Han, em 1990, demonstrou que a levanasacarase é uma enzima extracelular, indutiva e tem especificidade por sacarose. Porém em 2008, Beine e colaboradores, utilizaram compostos constituídos de alopiranose, frutose, fucose, galactose, manose e xilose como substrato para a enzima, e conseguiram que a levanasacarase produzisse diferentes oligossacarídeos com diferentes aplicações. Ela é responsável pela catálise da seguinte reação (Figura 2):

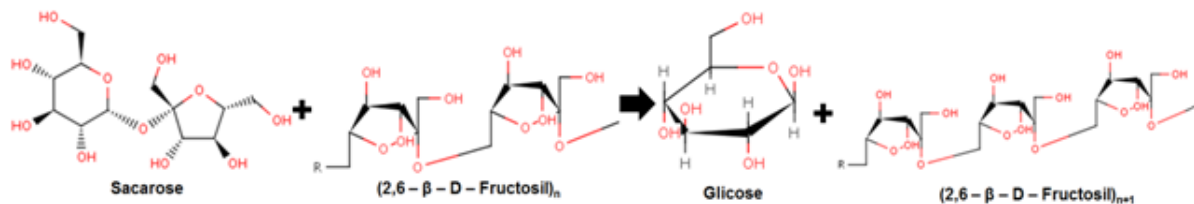


Figura 2 – Reação de hidrólise da sacarose e polimerização dos resíduos de frutose pela enzima levanasacarase.

A enzima hidrolisa a sacarose originando glicose e frutose, e ainda pode polimerizar a frutose e formar a levana, quando em meios com alto teor de sacarose (EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997; ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999a; MENG; FÜTTERER, 2003, GOLDMAN et al., 2008). Para tanto é necessário o uso de aceptores para ligar os resíduos frutosil, podendo ser a sacarose, água, álcoois e mono ou oligossacarídeos.

Verifica-se, portanto, que a fermentação da sacarose por *Bacillus subtilis* e a formação de exopolissacarídeo está intimamente ligada à taxa de hidrólise da sacarose, que, por sua vez, depende da temperatura e do pH do

processo fermentativo (LOPES et al., 1991; LYNESS; DOELLE, 1981; LYNESS; DOELLE, 1983).

A levanasacarase exerce duas atividades: a de hidrolase (hidrólise da sacarose) e polimerase (formação de levana). As duas atividades ocorrem simultaneamente (Han, 1990), Goldman et al. (2008), entretanto, verificaram que quando em pH superiores a 7, a enzima realizava na sua maioria, a atividade de hidrolase. Já para pH abaixo de 6, a enzima hidrolisava a sacarose, e a formação de levana era muito maior. Ainda há relatos, que concentrações de sacarose muito inferior a 30%, favorecem a atividade de hidrólise enquanto que próximo a 30% favorecem a atividade de transferase (SANGILYANDI; RAJ; GUNASEKARAN, 1999; MONSAN et al., 2001; MENG; FÜRTERER, 2003; OLVERA; CENTENO-LEIJA; LOPEZ-MUNGUÍA, 2007).

Martínez-Fleites et al. (2005) descrevem que o tamanho da cadeia, o tipo de ligação e as ramificações variam de acordo com a fonte da enzima. Por exemplo, a levanasacarase do *Bacillus subtilis* catalisa principalmente a formação de levanas de alta massa molar, sem acúmulo de oligofrutanas intermediárias, diferindo das Gram negativas, que sintetizam e acumulam grandes concentrações de frutoligossacarídeos.

Com relação as características do meio de cultivo, o pH e a temperatura, são os fatores mais importantes no que tange a atividade da enzima, sendo que a atividade varia de acordo com a origem enzimática. Segundo Morales-Arieta et al. (2006) o melhor pH encontrado foi de 6, próximo do valor de 5,2 e 5,6, reportado por Ammar et al. (2002) utilizando *Bacillus subtilis*, Kang et al. (2005), que utilizou *Leuconostoc mesenteroides*; Tieking et al. (2005) com *Leuconostoc sanfranciscensis* e El-Refai, Abdel-Fattah e Mostafa (2009) com *Bacillus circulans*. A temperatura, foi observada por Han (1990) e El-Refai, Abdel-Fattah e Mostafa (2009), que é ótima na faixa entre 30 e 40°C, diminuindo consideravelmente a atividade em faixa fora deste intervalo.

2.1.2 Produção de Levana

As condições de fermentação podem interferir na produção de levana, bem como nas suas características química e estrutural, seu tamanho e grau de ramificação, por exemplo, característica primordial para definir sua aplicação.

Segundo estudos (KEITH et al, 1991; BEKERS et al., 2000; ERNANDES; CRUZ, 2009; SHIH et al., 2005; BORSARI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; MELO et al., 2007; EL-REFAI; ABDEL-FATTAH; MOSTAFA, 2009) os fatores que mais influenciam e regulam a síntese de levana, são: fonte de carbono e sua concentração, tempo, temperatura, fonte de nitrogênio, oxigenação, pH, sais presentes no meio de fermentação, agitação e aeração. Além destes estudos, Bae et al. (2008) descrevem que a temperatura e a concentração de sacarose são fatores que mais contribuem para a variação da viscosidade da levana, podendo chegar a ter aspecto de plástico.

De acordo com Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999a), a sacarose do meio de cultura é um fator imprescindível para que ocorra a produção de levana, não sendo observada a produção em meios contendo apenas glicose e/ou frutose como fontes de carbono, uma vez que a levanassacarase hidrolisa a sacarose do substrato e polimeriza a frutose em levana. Ademais, a utilização de compostos constituídos de outros carboidratos que não sacarose como substrato, também podem interferir na produção de levana por microrganismos do gênero *Bacillus*, promovendo a formação de moléculas com composições químicas, estruturais modificadas e massas molares diferentes, possibilitando diferentes aplicações industriais (BEINE et al., 2008).

Para Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999b), Shih et al. (2005), Shih e Yu (2005), Kikuchi et al. (2009) e Melo (2009) a concentração ideal de sacarose no meio, que favorece a produção de levana, está entre 20 e 30 %, pois se observa que em concentrações superiores a levanassacarase começa a perder atividade e a produção é reduzida.

Com relação a distribuição da massa molar, Euzenat, Guibert e Combes (1997) afirmaram que há a formação de dois tipos de massas molares ao longo das fermentações, uma maior e outra menor, porém, com o decorrer desta, a massa molar diminui, uma vez que o microrganismo passa a consumi-la também.

Abdel-Fattah, Mahmoud e Esawy (2005) estudaram a síntese da levana e de frutoligossacarídeos por *Bacillus subtilis* usando sacarose e glicose como fontes de carbono, evidenciaram que a concentração da sacarose foi um dos fatores efetivos na distribuição da massa molar. Quando usaram concentrações inferiores a 5%, ocorreu a formação de levana de alta massa molar e em concentrações superiores a 5%, predominou levana de baixa massa molar.

Além da concentração da sacarose o pH é um fator importante e a faixa ótima está entre 5,8 e 7, dependendo do microrganismo utilizado (EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997; CALAZANS et al., 2000; WENDT, 2001; YOO et al., 2004; SHIH et al., 2005; SHIH; YU, 2005; ABDEL-FATTAH; MAHMOUND; ESAWY, 2005; POLI et al., 2009). Estudos demonstram que em pH mais baixos (3 e 4) há baixa produção de levana com alta massa molar e que em pH mais altos (5 e 6), concentram-se EPS de baixa massa molar (SHU; LUNG, 2004). Em estudos com *Zymomonas mobilis*, verifica-se que em pH 5, após 24 horas de cultivo, ocorreu a produção de levanas de alta massa molar.

Ainda podem ser considerados como fatores que interferem na distribuição da massa molar de levana produzida, o tempo e a temperatura da fermentação. Com relação ao tempo, Shih et al. (2005) observaram que após 7 horas de cultivo houve o predomínio de massa molar alta, porém com o aumento do tempo, ocorreu uma equivalência de ambas e ao final do processo apenas a de baixa massa molar foi identificada.

Levando em conta a temperatura do processo, tem sido relatado que o valor ótimo para produção de levana por *Bacillus subtilis* é de 37°C, sendo que abaixo desta, a atividade da levanasacarase é reduzida (DOELLE et al., 1993; EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997; OH et al., 2004; SHIH et al., 2005; SHIH; YU, 2005; BAE et al. 2008; POLI et al., 2009). Abdel-Fattah, Mahmoud e Esawy (2005) estudaram o efeito da temperatura na formação de levana e descreveram que quando esta é produzida na faixa entre 15 e 20 °C, a massa molar obtida é baixa, e ainda conforme a temperatura é elevada, a levana pode ser degradada uma vez que o EPS serve como reserva energética para o microrganismo.

Outros fatores que podem influenciar na produção de levana são: presença de levanas pré-formadas, força iônica e constante dielétrica dos meios de cultivo (CHAMBERT; PETIT-GLATRON, 1993). Verifica-se que a presença de levanas de baixa massa molar pode desencadear a formação de levanas de alta

massa molar, funcionando como iniciadora do processo (DOELLE et al., 1993). A produção de levana também é aumentada quando condições limitantes de crescimento são aplicadas ao microrganismo, como a ausências de biotina, ácido pantotênico ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no meio de cultura (MURO et al., 2000).

Ultimamente, tem se voltado para produção de levana em condições mais extremas, com o objetivo de obter um EPS com maior resistência a processos industriais. Segundo Poli et al. (2009) bactérias halofíticas do gênero *Halomonas*, apresentaram um bom potencial na produção de levana em condições de alta concentração de NaCl.

Ademais, existem patentes de otimização de produção de levana e levanasacarase, variando as condições e o conteúdo dos meios de cultivo, cepas mutantes de microrganismos, com menor poder de degradação de levana e cepas com alto potencial de produção de levanasacarase (MAKINO, 2006; MAKINO; OGAWA, 2007; ASANO, 2008; JAE, et al., 2009; KIM et al., 2009; SHIH; YOU, 2009). A cepa é de extrema importância no estudo da produção de levana, bem como o meio de cultivo e as condições de fermentação. Estes fatores podem favorecer a produção de moléculas de levanas diferentes, quanto a composição de açúcares, tipo de ligação, grau de ramificação, massa molar e a viscosidade (NEWBRUN; BAKER, 1968), interferindo nas propriedades reológicas e posteriores aplicações (BAE et al., 2008).

Utilizando cepas de *Bacillus subtilis* Natto, uma série de trabalhos obtiveram resultados expressivos para produção de levana. Shih e colaboradores (2005) conseguiram produzir 50 g.L^{-1} de levana em 21 horas, mesmo resultado encontrado por Shih e Yu (2005), enquanto que Shih, Chen e Yu (2010) alcançaram o maior valor de produção de levana reportado, $70,6 \text{ g.L}^{-1}$.

Borsari et al. (2006) conseguiram uma produção de levana igual a $40,14 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto que Melo et al. (2007) e Oliveira et al. (2007) alcançaram uma produção de levana igual a $14,67$ e $21,68 \text{ g.L}^{-1}$, utilizando *Zymomonas mobilis*. Estudando o mesmo microrganismo Chiang e Chao (2008), imobilizaram a levanassacarase e produziram 83 g.L^{-1} de levana. Melo (2009) e Takesue et al. (2009) utilizaram *Bacillus subtilis* e conseguiram uma produção de $43,7$ e $79,6 \text{ g.L}^{-1}$ de levana, respectivamente. Borsari e colaboradores (2010) obtiveram uma produção de $13,37 \text{ g.L}^{-1}$ de levana, também com *Z. mobilis*. Liu et al. (2010)

produziram 35,26 g.L⁻¹ de levana usando o microrganismo *Paenibacillus polymixa* EJS-3.

2.1.3 Aplicações

A levana vem se tornando economicamente competitiva em relação às gomas naturais de origem vegetal e de algas. Apresenta fácil recuperação e purificação, sua produção não é dependente de fatores sazonais, sendo produzida por diversos microrganismos (SERVIOUR et al., 1992; MURALIDHARAN; JAYACHANDRAN, 2003). Além disso, a levana apresenta características físico-químicas que a torna viável para sua aplicação em diversas áreas industriais como nas indústrias farmacêutica, de cosméticos e alimentícia (GHALY et al., 2007).

Na indústria alimentícia, Bae et al. (2008) descrevem que a reologia da levana favorecem sua aplicação, podendo ser utilizado como substituta da dextrana, por ter propriedades de viscosidade; como espessante de alimentos; carreador de sabor; carreador de fragrâncias; como adoçante e estabilizante devido sua viscosidade. Quanto a sua alta solubilidade e baixa viscosidade em soluções aquosas, pode ser considerada como substituta da goma arábica. Pode também ser aplicada na fabricação de produtos dietéticos e prebióticos (COTE, 1989; HAN; CLARKE, 1990; ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999a; CALAZANS et al., 1997; CALAZANS et al., 2000; BEKERS et al., 2001; SHIH et al., 2005; KIKUCHI et al., 2009; TEKESUE et al., 2009).

Alimentos que apresentam em sua composição compostos não digeríveis no trato gastrointestinal humano podendo promover benefícios a estes, pois quando na flora intestinal, favorece o crescimento de microrganismos probióticos, sendo considerados alimentos prebióticos (PAULA et al., 2008).

Os frutooligossacarídeos (FOS) vêm sendo estudados pelas suas propriedades como prebióticos (CARABIN; FLAMM, 1999; BIEDRZYCKA; BIELECKA, 2004). São constituídos de frutose e não digeríveis, portanto apresentam baixa caloria, podendo ser indicados para diabéticos. A levana pode ser hidrolisada por meio de microondas promovendo uma hidrólise mais rápida e pura, originando FOS (PAULA et al., 2008), esse atravessa todo o trato digestório sem ser

absorvida ou degradada até atingir a porção colônica. Ela pode ser fermentada pela flora intestinal favorecendo a proliferação de bifidobactérias, que tem efeito benéfico (BEINE et al., 2008).

A hidrólise enzimática de frutanas, como a levana, por β -frutosidases pode promover a formação de frutose pura, que pode ser muito utilizada na indústria de alimentos (MUÑOZ-GUTIÉRREZ; RODRIGUEZ-ALEGRÍA; MUNGUÍA, 2009).

A levana também vem sendo estudada na aplicação como película comestível (HUBER et al., 1994; CAVALCANTI et al., 2004; COMBIE, 2006; BARONE; MEDYNETS, 2007; KOCZAN et al., 2009), podendo ser uma tecnologia inovadora, que propicia o aumento do tempo de prateleira de frutas e verduras, além de ser ecologicamente correta e ter efeito probiótico.

Na área médica e farmacêutica apresenta efeito hipocolesterolêmico; hipoglicemiante; potencial de ação antitumoral; substituto do plasma sanguíneo; imunomodulador e prolongador do efeito de certas drogas. Estas aplicações são devido ao padrão de ramificação, o grau de polimerização e sua alta massa molar (DOELLE et al., 1993; CALAZANS et al., 2000; BEKERS et al., 2001; SHU; LUNG, 2004; YOO *et al.*, 2004). Verifica-se também, que a adição de levana, como componente ativo, em alimentos e na formulação de bebidas, auxilia no tratamento de doenças que provocam reações alérgicas, como asma, rinite, dermatite e conjuntivite (XU; TOSHIKAI, 2006).

A levana apresentou efeito imunoestimulador quando foi administrada nas dietas de peixes do gênero *Labeo rohita* (GUPTA et al., 2008) e *Cyprinus carpio* (RAIRAKHWADA et al., 2007). Além disso, em baixas concentrações (5 ppm), a levana possibilitou a proteção do gênero de camarão (*Artemia*) contra a ação do avarol, sugerindo seu potencial uso como agente anticancerígeno (POLI et al., 2009).

Na aplicação na indústria de cosméticos existem algumas patentes que fazem uso da levana, como: sabonete de limpeza facial (JAE et al., 2009); tratamento de rugas, peles secas e sardas (ASAI; JUNG; CHUNG, 2005) e inibidor de tirosinase, que é responsável pela pigmentação e produção de melanina com objetivo de tratar manchas e queimaduras de sol (FURUKAWA; TSUBOI, 2006). Segundo KIM et al. (2005), a levana demonstrou possuir efeitos anti-inflamatórios na irritação da pele e efeito proliferativo, podendo ser um potencial substituto do ácido hialurônico.

Manandhar, Vidhate e D'Souza (2009) aplicaram corrente elétrica em soluções de levana induzindo a formação de nanofibras, sugerindo uma nova e potencial aplicação da levana para a indústria têxtil, podendo substituir fibras originadas da indústria petroquímica, o que indiretamente poderia contribuir com a diminuição do impacto ambiental desta.

2.1.3.1 Atividade antitumoral

Considerando sua potencial ação antitumoral, pesquisas apontam que a massa molar do EPS parece estar relacionada com a atividade antitumoral, uma vez que se verificou que quanto maior a massa molar da levana, maior a inibição das células tumorais (CALAZANS et al., 2000; YOO et al., 2004). As levanas com alta massa molar, bem como algumas com grau de ramificação reduzido, apresentam atividade antitumoral quando aplicadas *in vivo* ou *in vitro*, em linhagens de células tumorais como o Sarcoma 180, Ehrlich carcinoma, carcinoma estomacal humano (SNU-1) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2) (CALAZANS et al., 1997; CALAZANS et al., 2000; OH et al., 2004; YOO et al., 2004; YOON et al., 2004).

Utilizando a levana produzida por 4 cepas diferentes de *Zymomonas mobilis*, Calazans e colaboradores (1997) aplicaram 200 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo de levana em camundongos suíços com sarcoma 180 e carcinoma Ehrlich, e observaram uma redução da massa tumoral que variou entre 22 e 74%. Em outro trabalho de Calazans et al. (2000) com levana de *Zymomonas mobilis*, na mesma concentração e com ratos, verificaram uma redução de até 72% da massa tumoral, ao utilizar a levana com massa molar de 456 kDa.

Yoo et al (2004) aplicando levanas de *Gluconoacetobacter xylinus*, *Microbacterium laevaniformans*, *Rahnella aquatilis* e *Zymomonas mobilis*, com massas moleculares iguais a 40, 710, 380 e 570 kDa, respectivamente, observaram uma redução da massa tumoral, que variou entre 39 e 68%, quando aplicadas em carcinoma estomacal humano (SNU-1) e fígado (HepG2) na concentração de 1000 ug.mL⁻¹. Yoon et al. (2004) com auxílio da enzima inulinase, promoveram diferentes taxas de ramificação da molécula de levana de *Microbacterium laevaniformans*, e

obtiveram reduções de até 60% no crescimento celular das linhagens SNU-1 e HepG2, quando a taxa de ramificação era igual a 12,3% e na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, diminuindo conforme a taxa diminuía.

Oh et al. (2004) também utilizando as linhagens tumorais SNU-1 e HepG2, fracionaram a levana de *Microbacterium laevaniformans* em diferentes massas molares e observaram reduções do crescimento celular de até 84% ao utilizarem levana com massa molecular igual a 80 kDa na concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Além da levana, muitos outros estudos apontam o uso de diferentes exopolissacarídeos que possuem efeito antitumoral, surgindo, assim, uma nova abordagem contra o câncer. Nomura et al. (1998) enriqueceram a mitomicina C com dextrana, favorecendo a permanência da droga nas células tumorais, estes estudos foram realizados com cepas de bactérias ácido lácticas. Madiedo, Hugenholtz e Zonn (2002) utilizaram bactérias ácido lácticas e produziram uma série de EPSs prebióticos com potencialidade de inibição tumoral.

Ainda, vale ressaltar que os fungos também exercem papel importante na produção de exopolissacarídeos com atividade antitumoral, como é observado nos trabalhos de Peng et al. (2005) que utilizaram o fungo *Ganoderma tsugae* e produziram o eps GTM, promovendo uma redução de 73% da massa tumoral do sarcoma 180 quando utilizado 160 mg.kg^{-1} . Cui et al. (2007) observaram que o EPS de *Grifola frondosa* GF9801 na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, reduziu a proliferação do tumor MCF-7 em 65%, enquanto que Chen et al. (2008) aplicaram o EPS produzido por *Fomes fomentariuse* em cultura celular de câncer gástrico humano (SGC 7901) e promoveram uma inibição do crescimento celular de 50% em apenas 24 horas utilizando 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do EPS. Tong et al. (2009) conseguiram 75% de inibição do crescimento celular, utilizando o EPS de *Pleurotus ostreatus* em uma concentração de 200 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em tumor Hela.

2.1.3.2 Atividade hipoglicêmica e hipocolesterolêmica

O *diabetes* é uma doença crônica, cuja incidência cresce cada vez mais, provocando um elevado número de óbitos e alterando o cotidiano de muitas

peessoas. Além de proporcionar o aumento de glicose plasmática (ZOU et al., 2010), o *diabetes* também eleva a concentração plasmática de colesterol (YAO; HUANG; CHIANG, 2008), facilitando o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (TZANG et al., 2009). Desta forma, o investimento em pesquisa e tratamento das pessoas portadoras é extremamente necessário.

Atualmente, muitas pesquisas destinam-se para resolução deste problema, fazendo uso de diversos organismos, como plantas, fungos, bactérias, entre outros na produção de compostos, em sua grande maioria polissacarídeos, que apresentam potencial hipoglicêmico e hipocolesterolêmico.

Dentre os trabalhos que utilizaram extratos vegetais e seus polissacarídeos, destacam-se os estudos realizados com um polissacarídeo de *Lycium barbarum* L., denominado LBP-1, que quando era aplicado em cultura celular, protegia e recuperava as ilhotas pancreáticas, promovendo uma diminuição dos valores de glicose plasmático, bem como a resistência à insulina em células hepáticas. Outra espécie vegetal, a *Rehmannia glutinosa*, produz um oligossacarídeo (ROS), que na concentração de 100 mg.kg⁻¹, proporcionou a diminuição em até 60% dos teores de glicose plasmática tanto em ratos hiperglicêmicos quanto em ratos diabetogênicos induzidos por aloxana, e ainda aumentou em 45% os níveis de insulina deste último grupo (ZOU et al., 2010; ZHANG et al., 2004).

O fruto *Physalis alkekengi* L. possui em sua constituição um heteropolissacarídeo ácido (PPSB) com massa molar igual a 27 kDa, que quando administrado a uma concentração de 100 mg.kg⁻¹ em camundongos diabéticos induzido por aloxana, observou-se uma diminuição nos valores de glicose plasmática em 30% (TONG; LIANG; WANG, 2008). Chen et al. (2009) fazendo uso de uma β -frutana, semelhante ao EPS levana, originada da raiz tuberosa de *Liriope spicata*, isolaram dois polissacarídeos com massa molar equivalente a 3.2 (LSP1) e o outro a 4.29 kDa (LSP2), quando administrado nas concentrações de 100 e 200 mg.kg⁻¹ em camundongo, proporcionaram uma redução da concentração de glicose plasmática de 70%, mesma redução promovida pelo medicamento Rosiglitazone utilizado nos testes.

Outro componente vegetal, porém, que demonstrou potencial hipocolesterolêmico, foi o óleo de linhaça, que ao ser administrado na dieta de hamsters, favoreceu uma ligeira diminuição dos teores de colesterol no fígado

destes animais, em comparação aos que receberam em sua dieta manteiga e óleo de coco. Os autores atribuíram a este fato um aumento do receptor LDL no plasma sanguíneo, tendo por base resultados da expressão gênica (TZANG et al., 2009).

A contribuição fúngica para a produção de polissacarídeos hipoglicêmicos e hipocolesterolêmicos também é bem explorada. A espécie *Phellinus baumii* produz dois tipos de EPS e dois tipos de proteoglicanas, que quando administradas oralmente (200 mg.kg^{-1}) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ), reduziram a glicose plasmática em 52,3%. Porém quanto à concentração de colesterol plasmático, não se observou alteração quando da administração do EPS (HWANG et al., 2005). Já o fungo *Cordyceps sinensis* produz um polissacarídeo de massa molar equivalente a 210 kDa, conhecido como CSP-1, que Li et al. (2006) aplicaram nas concentrações de 200 e 400 mg.kg^{-1} em camundongos e ratos diabetogênicos induzidos por aloxana e STZ respectivamente, e observaram que ocorreu uma redução de até 22% na concentração de glicose plasmática e um aumento na produção de insulina nos animais diabéticos.

Miranda (2006) utilizando fungo *Botryosphaera rhodina* produziram o EPS botriosferana e observaram que em uma concentração igual a 3 g.L^{-1} houve uma redução de 48% dos níveis de glicose plasmática em ratos diabéticos induzidos por STZ. Já em ratos hipercolesterolêmicos, observaram uma redução de 10% dos níveis de glicose plasmática e de 19% do nível do colesterol total.

El-Gawad e colaboradores (2005) alimentaram ratos com iogurtes contendo os microrganismos *Bifidobacterium lactis* Bb-12 e *Bifidobacterium longum* Bb-46 e obtiveram uma diminuição de até 50% nos níveis de colesterol plasmático e um aumento de 36% na taxa de lipoproteínas de alta densidade (HDL) plasmático.

A quitosana, derivada da quitina, presente em conchas de crustáceos, também apresenta efeitos hipoglicêmico e hipocolesterolêmico. Quanto utilizada em ratos diabéticos induzidos por STZ, a quitosana, de baixa massa molar, reduziu o teor de colesterol em 13% e não alterou a glicemia em ratos normais. A quitosana de alta massa molar reduziu a glicemia e o colesterol plasmático dos ratos diabetogênicos em 40 e 80% respectivamente (YAO; HUANG; CHIANG, 2008). Em trabalho também utilizando a quitosana, Liu, Zhang e Xia (2008) estudaram o efeito hipocolesterolêmico *in vitro* e *in vivo*, utilizando ratos, e observaram que as quitosanas, de alta massa molar e alta desacetilação, reduziram em 26 e 36% os

valores plasmáticos de colesterol e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), respectivamente, aumentando em 18% de HDL.

A utilização de levana microbiana na redução glicêmica e colesterolêmica foram estudadas por Yamamoto e colaboradores (1999) que verificaram uma inibição da absorção de esteróis pelo intestino quando foi utilizado 1 e 5% de levana de alta massa molar (2000kDa), em dietas hipercalórica de ratos, e a redução dos valores de colesterol plasmático foi até de 40%, e os de glicose plasmática de até 10%. Kang et al. (2006) utilizando levanas de alta massa molar nas concentrações de 1, 5 e 10% em ratos obesos, verificaram que ela teve efeito como agente hipolipidêmico, uma vez que inibiu a lipogênese e estimulou a lipólise.

2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LEVANA

Para a produção de levana o microrganismo deve ter a enzima levanasacarase, ser fermentador e estar em meio contendo sacarose, principalmente, como fonte de carbono. Dentre os microrganismos com estas características destaca-se o *Bacillus subtilis*, uma bactéria gram positiva, em forma de bastonete, formadora de esporo rígido, saprófita, aeróbia e geralmente encontrada no solo, podendo também estar presente na água e no ar (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; MADIGAN; MARTINKO, 2005). O seu uso torna-se vantajoso uma vez que este microrganismo não apresenta patogenicidade contra o ser humano (RYAN; RAY, 2004).

As espécies do gênero *Bacillus* vêm de longa data, sendo utilizada nos processos biotecnológicos, como na produção enzimática, principalmente extracelular, fermentação de alimentos entre outros. Ainda, por apresentar muitas espécies consideradas de grau GRAS, este gênero está entre os mais importantes na utilização de processo industriais (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004; HONG et al., 2008; SHIEH; THI; SHIH, 2009).

2.2.1 Bacillus Subtilis Natto

O *Bacillus subtilis* tem sido estudado como produtor de levana (EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997) em altas quantidades em meio contendo sacarose, e com características para diversas aplicações industriais (ABDEL-FATTAH; MAHMOUND; ESAWY, 2005; SHIH et al., 2005).

Apresenta rápido crescimento, o que reduz o tempo do processo de fermentação, e excreta seus produtos no meio extracelular, assim o torna candidato potencial para uso industrial (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Shih e Yu (2005) isolaram uma nova variedade de *Bacillus subtilis* e verificaram que, quando esta bactéria era crescida em meio contendo 20% de sacarose produzia grandes quantidades de levana, que até então não tinham sido alcançadas. A esta nova variedade foi dado o nome de *Bacillus subtilis* Natto, que vem sendo utilizada ultimamente por ter potencial de aplicação industrial.

Alimentos fermentados de soja são bastante utilizados nos continentes Africano e Asiático (JEYARAM et al., 2008; PHROMRAKSA et al., 2008). O *Bacillus subtilis* Natto é uma bactéria gram positiva (HOSOI et al., 2003) e foi isolada do alimento japonês Natto. Este alimento está presente na cultura japonesa por mais de 1000 anos, propiciando melhor qualidade de vida aos seus consumidores, uma vez que, promove benefícios em inúmeros processos fisiológicos, como: agente anti-hipertensivo, antitrombótico, antitumoral e como hormônios em algumas situações (WANG et al., 2007).

A obtenção deste alimento é feita por meio de fermentação de grãos de soja pelo microrganismo *B. subtilis* Natto (HOSOI et al., 2003; SHIH, et al., 2005; SHIEH; THI; SHIH, 2009; UEMENE et al., 2009). Sendo que a ingestão de células ou esporos de *B. subtilis* Natto e seus produtos não são prejudiciais à saúde humana, podendo atuar também, como um alimento prebiótico (KENGATHARAN et al., 1998; OGGIONI; POZZI; VALENSIN, 1998; HOSOI et al., 2003).

O *B. subtilis* Natto é uma cepa que tem demonstrado boa eficiência em fermentação batelada para produção de levana, em temperaturas entre 35 e 37°C, pH neutro e sob agitação. Para seu crescimento é necessário fontes nutricionais de magnésio, fosfato, carbono (sacarose) e nitrogênio (orgânico e

inorgânico) (SHIH; YU, 2005; SHIH et al., 2005; HSU; CHIANG, 2009; SHIEH; THI; SHIH, 2009; UEMENE et al., 2009).

Shih et al. (2005) verificaram que o *B. subtilis* Natto produz levanas com pesos moleculares diferentes, e que estas levanas produzidas são facilmente separadas por fracionamento de gradiente de etanol, possibilitando ainda, aplicações em diferentes áreas industriais, devido as diferentes massas molares.

2.3 METABOLÔMA

O estudo do metabolismo, mais precisamente de erros inerentes ao metabolismo, começou em meados dos anos 60 com a cromatografia gasosa e espectroscopia de massa (GATES; SWEELEY, 1978).

Um metabólito pode vir a ser um substrato para uma via e quando este tem sua concentração alterada pode inibir ou acelerar outra. Estas concentrações podem variar não apenas devido as enzimas que catalisam sua reação, mas também, devido a mudanças do ambiente interno, que pode variar a cada minuto (GRIFFITHS, 2003).

O estudo das ômicas teve início com a era da genômica, após este período estudos levando em conta a transcriptômica começaram a ganhar espaço. No final da década de 90 e início do século 21 a proteômica ganhou o foco de estudo e juntamente surgiu a metabolômica, que leva em consideração uma visão de todo o metabolismo e analisa os metabólitos produzidos em nível celular, quantitativamente e qualitativamente, fazendo a conexão entre o genótipo e o fenótipo do organismo (FIEHN, 2001).

A metabolômica é a ciência que estuda o metabolôma, que pode ser definido como todo conteúdo metabólico de um tecido celular ou organismo em um determinado tempo (DAVIS; MILNER, 2004) e reflete o real estado fisiológico de um determinado material biológico (GOODACRE et al., 2004; van der WERF; JELLEMA; HANKEMEIER, 2005). Vem sendo muito estudada em microrganismos e vegetais, porém o estudo sistemático do metabolôma de células animais ainda não vem sendo muito explorado, por levar a compreensão dos estudos em questão (FIEHN, 2001).

O estudo metabolômico complementa informações obtidas de outras ômicas, como a genômica, transcritoômica e proteômica, possibilitando um estudo mais específico e completo de doenças fisiológicas, identificação de biomarcadores, regulação do metabolismo e ação de drogas. Esta ciência avalia todos os metabólitos envolvidos no ambiente celular, permitindo uma análise dinâmica do metabolismo associado há condições de interesse, por exemplo, doenças como câncer ou algum tratamento (ter KUILE; WESTERHOFF, 2001; LINDON et al., 2000; LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2004; HOLMES; WILSON; NICHOLSON, 2008; KADDURAH-DAOUK; KRISTAL; WEINSHILBOUM., 2008; WISHART, 2008a).

Para este estudo é necessária a extração e a quantificação dos metabólitos de tecidos celulares ou fluidos corporais com objetivo de se obter o perfil metabólico. Os compostos analisados servem para identificação de alterações do metabolismo que causam um determinado problema (WU et al., 2008). Geralmente, pode haver a desregulação de um grupo de metabólitos, que altera sua concentração em detrimento da doença ou da ação medicamentosa, desta forma, a metabolômica tem o potencial de gerar informações sobre um determinado processo fisiológico (QUINONES; KADDURAH-DAOUK, 2009).

Esta área tem contribuído para o desenvolvimento de diagnósticos de doenças e estudos científicos (SLIM et al., 2002; BURNS et al., 2004; ZEISEL et al., 2005; KUSSMANN; RAYMOND; AFFOLTER, 2006), como na elaboração de técnicas de análise e quantificação dos metabólitos (BAJAD; SHULAEV, 2007; TANAKA et al., 2007).

As duas técnicas de análise mais empregadas no processo são a ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$) e a espectroscopia de massa, que são técnicas de alta especificidade (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2004; DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) é uma técnica que permite identificar e/ou quantificar misturas complexas de compostos químicos (WISHART, 2008b). A utilização da NMR data do início da década de 70 fazendo uso da análise do isótopo traço, que tinha como objetivo decifrar o metabolismo do etanol (WILSON et al., 1974). Esta técnica é utilizada para analisar os perfis dos metabólitos provindos de tecido celular e biofluidos corpóreos, possibilitando a identificação de diferenças nos metabólitos pela análise de algoritmos (HINES et al., 2007; QUINONES; KADDURAH-DAOUK, 2009).

O estudo do metaboloma por (^1H - NMR) vem sendo explorado em diversos trabalhos com objetivo de melhorar a qualidade do produto final, fornecer prognósticos e subsídios para novos estudos, principalmente, para compreender o comportamento dos compostos nas vias metabólicas em diversas situações, como por exemplo: definição de fenótipos metabólicos de células, tecidos e organismos no processo carcinogênico (GRIFFIN; SHOCKCOR, 2004); alteração na concentração metabólica de neurotransmissores na doença de Batten (PEARS et al., 2005), acompanhamento da indução de apoptose celular (LUTZ, 2006); desenvolvimento de mapas metabólicos de diversos tipos de tumores para possíveis tratamentos (VIZÁN; MAZUREK; CASCANTE, 2008); investigação da reprogramação das vias do metabolismo primário e secundário em *Papaver somniferum*, ópio (ZULAK et al., 2008), caracterização metabólica de tecido benigno e maligno de adenocarcinoma retal humano (JORDAN et al., 2009); identificação de vias metabólicas alteradas pelo *diabetes* tipo I (LANZA et al., 2010) entre outros.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Box, Hunter e Hunter (1978) relataram que a combinação de fatores pode originar uma resposta ótima, quando se faz uso do delineamento fatorial aliada a metodologia de superfície de resposta. Considera-se que a análise estatística “um fator a cada tempo” geralmente é limitada quando se torna necessário encontrar o ponto ótimo, uma vez que não leva em consideração a integração dos fatores.

Ultimamente o delineamento estatístico vem sendo empregado em bioprocessos que necessitam de otimização. Dentre as metodologias, destaca-se a superfície de resposta, que permite a identificação individual, de forma integrada e previsões de cada fator analisado, fornecendo dados confiáveis sobre o processo, o que possibilita a otimização do processo, uma vez que determinam o ponto ótimo de um dado experimento, reduzindo custo e tempo ao final do processo (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 1995; BORSARI et al., 2006; BABU et al., 2008; SILVEIRA; DAROIT; BRANDELLI, 2008; ZHANG et al., 2010).

Muitos trabalhos recentes obtiveram sucesso na obtenção de produtos biológicos utilizando a metodologia de superfície de resposta e

delineamento fatorial, dentre eles: Produção de sorbitol (VIGNOLI; CELLIGOI; SILVA, 2005; VIGNOLI et al., 2010), otimização da produção de frutossiltransferase (BABU et al., 2008); otimização da atividade de urease em função do íon cádmio (PRAKASH et al., 2008); otimização da produção de exopolissacarídeos produzidos por *A. luteo-virens* Sacc (YING-CHUNG JIAO et al., 2008); novo exopolissacarídeo biofloculante (HE et al., 2009); otimização da atividade de urease em função do íon mercúrio (PRAKASH; TALAT; HASAN, 2009); reação de transesterificação na formação do biodiesel (FERELLA et al., 2010).

Fazendo uso desta ferramenta, muitos autores buscam a melhor produção de levana. Borsari et al. (2006) e Melo (2009) utilizaram o planejamento fatorial (2^3) e conseguiram uma alta produção de levana utilizando caldo de cana de açúcar. Oliveira et al. (2007) usaram três planejamentos fatoriais seguidos para otimizar a concentração e o tipo da fonte de sacarose, tempo de fermentação e constituintes do meio na produção de levana. Utilizando fatorial fracionado (2^{4-1}), Melo et al. (2007) e Borsari et al. (2010) analisaram a influencia dos constituintes do meio e das condições de cultivo na obtenção de levana por *Zymomonas mobilis*. Liu et al. (2010) aplicaram um fatorial fracionado com dois níveis seguido por um delineamento central composto e otimizaram o meio de cultivo para produção de levana por *Paenibacillus polymyxa* EJS-3.

No entanto, para otimizar processos utilizando a metodologia de superfície de resposta, alguns pré-requisitos devem ser seguidos: a seleção das variáveis independentes, a escolha do delineamento fatorial, realização do tratamento estatístico, a adequação do modelo, a observação da previsão do ponto ótimo e por fim a obtenção dos valores ótimos de cada variável estudada (BEZERRA et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir levana de *Bacillus subtilis* Natto, caracterizar e testar suas aplicações como agente anticarcinogênico e hipoglicêmico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produtividade da levana de *Bacillus subtilis* Natto, em diferentes condições de cultivo, por metodologia de superfície de resposta;
- Produzir levana em escala maior, a partir da melhor condição e caracterizar por cromatografia de exclusão molecular de alta performance (HPSEC-RID-MALLS);
- Testar a atividade hipoglicêmica da levana em ratos machos diabetogênicos da linhagem Wistar;
- Analisar a atividade antitumoral da levana em células tumorais hepáticas (HepG2) por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a cepa de *Bacillus subtilis* Natto, isolada do alimento japonês natto, no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia e identificada nos laboratórios da Coleção de Culturas Tropicais – Fundação André Tosello - Campinas - SP – Brasil, por meio de testes bioquímicos, sistemas de identificação Vitek (porcentagem de identificação 81%), API (porcentagem de identificação de 98,3%) e comparação com a literatura.

4.1.2 Meios de Cultura

4.1.2.1 Meio de preservação

Tabela 2 – Meio de preservação para *Bacillus subtilis*.

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Peptona	50
Extrato de carne	30
Ágar	20

4.1.2.2 Meio de inóculo

Tabela 3 – Meio de inóculo

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Sacarose	100
Extrato de levedura	2
KH ₂ PO ₄	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,5

Fonte: Calazans et al. (2000).

4.1.2.3 Meio de fermentação

Tabela 4 – Meio de fermentação

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Sacarose	300
Extrato de Levedura	2
KH ₂ PO ₄	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,6
MnSO ₄	0,2
Amonio Citrato	0,25

Fonte: Euzenat, Guibert e Combes (1997, modificado).

4.1.2.4 Meio de cultura de células tumorais

Tabela 5 – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Formulation (Sigma Aldrich, Inc.), para cultivo da cultura de tecidos.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)					
Sais Inorgânicos (g.L⁻¹)		Aminoácidos (g.L⁻¹)		Vitaminas (g.L⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.265	L-Arginina.HCl	0.084	Cloreto de Colina	0.004
Fe(NO ₃) ₃ . 9H ₂ O	0.0001	L-Cisteina.2HCl	0.0626	Ácido Fólico	0.004
MgSO ₄ (a)	0.0976	Glicina	0.03	Mio-Inositol	0.0072
KCl	0.4	L-Histidina.HCl.mono (a)	0.042	Niacinamida	0.004
NaHCO ₃	3.7	L-Isoleucina	0.105	Ácido D-	0.004
				Pantotenico. ½Ca	
NaCl	6.4	L-Leucina	0.105	Piridoxina.HCl	0.004
Na ₂ HPO ₄ (a)	0.109	L-Lisina.HCl	0.146	Riboflavina	0.0004
		L-Metionina	0.03	Tiamina.HCl	0.004
		L-Fenilalanina	0.066		
		L-Serina	0.042		
		L-Treonina	0.095		
		L-Triptofano	0.016		
		L-Tirosina.2Na.di (a)	0.1038		
		L-Valina	0.094		
Açúcar (g.L⁻¹)		Outros (g.L⁻¹)		Adicionados (g.L⁻¹)	
D-Glicose	4.5	Vermelho Fenol	0.0159	L-Glutamina	0.584

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preservação do Microrganismo

O *B. subtilis* Natto foi crescido em meio de preservação, como descrito no item 4.1.2.1, 37 °C, por 48 horas e mantido a 4 °C em câmara

refrigerada. O repique das células foi realizado a cada quarenta e cinco dias. A verificação da pureza foi observada por coloração de gram.

4.2.2 Planejamento Estatístico

O planejamento estatístico foi realizado com o objetivo de obter alta produtividade de levana. A princípio, um modelo experimental foi desenvolvido de acordo com o planejamento fatorial 3^3 incompleto Box e Behnken (1960), com 15 ensaios e 3 repetições no ponto central. Foi utilizado o meio de fermentação descrito no item 4.1.2.3, tendo as seguintes variáveis: pH (X_1) variando entre 5, 6 e 7; temperatura (X_2) variando entre 25, 31 e 37°C e tempo (X_3) variando entre 12, 18 e 24 horas, sendo os níveis de variações decodificados em -1, 0 e 1, tabela 6. A concentração de sacarose e a agitação foram fixadas em 300 g.L⁻¹ e 100 rpm respectivamente, de acordo com dados previamente testados no laboratório do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

Com base nos resultados desse delineamento, um segundo planejamento Box e Behnken (1960) foi proposto, as variáveis foram mantidas, porém seus valores foram modificados e correspondem a: (X_1) temperatura 32, 37 e 42°C, (X_2) tempo 18, 24 e 30 horas e (X_3) pH 7, 8 e 9, podem ser observados na tabela 7. A concentração de sacarose e a agitação foram fixadas em 300 g.L⁻¹ e 100 rpm. A resposta analisada foi a produtividade de levana g.L⁻¹ (Y_1).

Tabela 6 – Delineamento fatorial Box – Benhken (3^3) para avaliar os efeitos do pH, temperatura e tempo na produtividade de levana (Y_1) de *Bacillus subtilis* Natto em 300 g.L^{-1} de sacarose a 100 rpm.

Ensaio	Variáveis Decodificadas			$Y_1 (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	
2	1	-1	0	
3	-1	1	0	
4	1	1	0	
5	-1	0	-1	
6	1	0	-1	
7	-1	0	1	
8	1	0	1	
9	0	-1	-1	
10	0	1	-1	
11	0	-1	1	
12	0	1	1	
13	0	0	0	
14	0	0	0	
15	0	0	0	

Variáveis Originais		Níveis de Variação		
		-1	0	1
X_1	pH	5	6	7
X_2	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	31	37
X_3	Tempo (horas)	12	18	24

Tabela 7 – Segundo delineamento fatorial Box – Benhken (3^3) para a máxima produtividade de levana (Y_1) por *Bacillus subtilis* Natto em 300 g.L^{-1} de sacarose a 100 rpm.

Ensaio	Variáveis Decodificadas			$Y_1 (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	
2	1	-1	0	
3	-1	1	0	
4	1	1	0	
5	-1	0	-1	
6	1	0	-1	
7	-1	0	1	
8	1	0	1	
9	0	-1	-1	
10	0	1	-1	
11	0	-1	1	
12	0	1	1	
13	0	0	0	
14	0	0	0	
15	0	0	0	

Variáveis Originais		Níveis de Variação		
		-1	0	1
X_1	pH	7	8	9
X_2	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	32	37	42
X_3	Tempo (horas)	18	24	30

4.2.3 Processo Fermentativo

4.2.3.1 Inóculo

O inóculo foi obtido por meio de fermentação em batelada, em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio de inóculo descrito no item 4.1.2.2, durante 48 horas a 37 °C. Após o tempo de cultivo, o meio foi centrifugado por 10 minutos a 9056 g e as células foram ressuspensas assepticamente em solução salina (NaCl a 0,9 %).

Posteriormente foram realizadas leituras de absorvância a 605 nm e estas foram correlacionadas com sua respectiva curva de biomassa em g.L^{-1} . Todas as fermentações foram padronizadas com inóculo de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de células.

4.2.3.2 Fermentações

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio descrito no item 4.1.2.3, mantendo a concentração de sacarose em 300 g.L^{-1} e a agitação de 100 rpm. O pH, a temperatura e o tempo foram variados de acordo com a tabela 7 e 8.

A interrupção dos cultivos foi realizada por centrifugação a 9056 g por 15 minutos a 4°C, para a separação da biomassa. O sobrenadante foi utilizado para testar a produtividade e produção de levana, bem como o consumo de açúcares pelo microrganismo.

4.2.4 Métodos Analíticos

4.2.4.1 Determinação dos açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT) das fermentações

Os açúcares redutores do início e do final das fermentações foram dosados pelo método de Somogyi (1952) e Nelson (1944) e as absorvâncias foram medidas a $\lambda = 540$ nm. Os açúcares totais das fermentações foram dosados pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e as absorvâncias medidas a $\lambda = 490$ nm.

Para a confecção das curvas padrões, foi utilizado padrão de glicose, variando as concentrações entre 0 a 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

4.2.4.2 Quantificação da levana

Para obtenção da levana do sobrenadante do meio de fermentação, para determinar sua produção, foi utilizado etanol 90% a 4 °C na proporção de 3:1 (etanol: sobrenadante) para a precipitação em “overnight” do EPS. Após este tempo, a levana foi centrifugada a 21382 g por 20 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C. O “pellet” formado foi lavado em 3 volumes de etanol 90% gelado e centrifugado novamente.

Desta forma, a levana foi ressuspensa em 1 mL de HCl 1N e hidrolisada por uma hora a 100 °C, resfriada e neutralizada com 0,1 mL de NaOH 2N segundo Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999a), modificado.

A concentração de levana foi estimada pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944), por meio de açúcares redutores, utilizando glicose como padrão, em concentrações de 0 a 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. As leituras das absorvâncias foram realizadas em $\lambda = 540$ nm.

4.2.4.3 Determinação da massa molar e homogeneidade da levana por cromatografia de exclusão molecular de alta performance

A levana foi obtida do sobrenadante do meio de cultivo, que apresentou a melhor produtividade, de acordo com o item 4.2.4.2, sendo posteriormente dialisada contra água corrente e água deionizada e liofilizada.

Após a liofilização, uma alíquota do EPS foi separada e sua massa molar foi determinada por cromatografia de exclusão molecular de alta performance. Para tanto, foi utilizado o aparelho HPSEC (Waters, MA, USA), acoplado a um refratômetro diferencial (RI) e ao laser de dispersão de luz multi-angular (Dawn-F, Tecnologia Wyatt, Santa Barbara, CA, USA), para testar a levana (0,2% (w/v) em H₂O). Foram utilizadas quatro colunas Waters, Ultrahidrogel 2000/500/250/120, conectadas em série e acopladas aos detectores de índice de refração e ao MALLS. Como solvente foi utilizado uma solução de NaNO₃ 0,1M contendo NaN₃ (0,5 g.L⁻¹).

4.2.5 Análise Estatística

As respostas referentes às produtividades de levana (Y_1) obtida dos planejamentos estatísticos (Tabela 6 e 7), foram submetidas ao programa STATISTICA 7.0 para análise de variância com índice de confiança de 0,05 e metodologia de superfície de resposta.

4.2.6 Fermentação em Escala Maior

A melhor condição de produtividade foi submetida a uma fermentação em maior escala, com o objetivo de obter uma maior quantidade de levana para a sua aplicação. As fermentações foram realizadas em 4 erlenmeyers de 2 litros com volume de trabalho de 500 mL. A levana então foi precipitada, dialisada e liofilizada.

4.2.7 Análise da Atividade Hipoglicemiante da Levana

4.2.7.1 Preparo da solução

Foi preparada uma solução de levana, da condição otimizada, na concentração de 200 mg.kg^{-1} de peso corpóreo dos animais (YOO et al., 2004; CHO et al., 2007), em água destilada. Após a solubilização completa da solução, esta foi autoclavada em vapor fluente à 120°C por 20 minutos e, após resfriamento, foi transferida para recipiente previamente esterilizado com volume suficiente para o desenvolvimento dos ensaios biológicos.

4.2.7.2 Protocolo experimental para análise de atividade hipoglicemiante

Foi desenvolvido um projeto piloto para analisar a atividade hipoglicemiante da levana. Para tanto, foram utilizados 20 ratos adultos machos da linhagem Wistar, com peso médio de 200 g, que foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina – Paraná – Brasil, e mantidos em gaiolas individuais, no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL, onde receberam água e alimento (ração para roedores Nivulab) *ad libitum*, durante o decorrer de todo tratamento.

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais em Experimentação da UEL (CEEA - UEL) sob nº 07/10, processo nº. 1171/2010-08.

Os animais constituíram 4 grupos, com 5 ratos em cada grupo, da seguinte maneira: normal sem levana, normal com levana, diabético sem levana e diabético com levana. Os grupos sem levana receberam como tratamento água destilada via gavagem. Estes foram tratados com 0,3 mL de salina, uma vez ao dia, durante 15 dias.

Os animais pertencentes aos grupos controle positivos receberam injeção intraperitoneal de estreptozotocina (Sigma Chemical Co.) (STZ) dissolvida

em solução tampão de citrato (pH 4,5 e 0,01 M) na dose de 65 mg.kg^{-1} de peso corpóreo, para indução do diabetes (BOLKENT et al., 2000). Dois dias após a injeção do agente diabetogênico (STZ) a glicose foi determinada na urina, por glicosídeos, sendo que os animais que apresentaram uma taxa acima de 250 mg.dL^{-1} , foram considerados animais diabéticos.

Nos grupos controle negativo e positivo com levana, foi administrado 0,3 mL do EPS, uma vez ao dia, via gavagem, durante o decorrer de todo tratamento, respeitando o mesmo intervalo de aplicações da água destilada. A concentração utilizada de levana no experimento foi de 200 mg.kg^{-1} de peso corpóreo. O ganho de peso ao longo do experimento foi analisado em todos os grupos, bem como, o consumo médio de ração, medido em gramas de alimento consumido para cada 100 g de peso corpóreo ($\text{g.100g}^{-1} \text{ p.c.}$).

Após o último dia de tratamento, os animais foram colocados em jejum por 16 horas e submetidos à eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado em tubos heparinizados (Liquemine 5000 UI) e centrifugado a 7000 g por 30 minutos para a separação do plasma. Imediatamente após a separação, foram realizadas as dosagens de glicose plasmática pelo método de oxidase/peroxidase; colesterol total plasmático pelo método de esterase/peroxidase/oxidase e triglicérides pelo método de lipase/gliceroquinase/glicerol-P oxidase, todos utilizando os kits bioquímicos (Biodiagnóstica), para testar a atividade hipoglicemiante da levana. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$) e test t de student.

4.2.8 Análise Metabolômica da Atividade Antitumoral da Levana por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$)

4.2.8.1 Cultura celular

A linhagem de células tumorais de carcinoma hepático humano (HepG2), foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cedidas pelo Laboratório de Genética Toxicológica do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina. As células foram cultivadas em meio de cultura

líquido DMEM (Sigma Aldrich, Inc.) Tabela 4, suplementado com 10% de soro bovino fetal na concentração de 10^7 . As células foram incubadas por 48 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. A levana foi administrada em uma concentração de 1 mg.mL⁻¹ (YOO et al, 2004) de meio de cultura. O meio sem levana, recebeu 1 mg.mL⁻¹ de tampão fosfato salino (PBS). Após a realização dos cultivos, metade do meio de cultura foi separado e congelado para posterior análise. As células aderidas nas paredes dos frascos, foram tripsinizadas a 37°C, lavadas 2 vezes com PBS gelado e inativadas com a outra metade do meio não utilizada. Por fim, as células foram transferidas para tubos de centrifuga, nos quais foram centrifugadas por duas vezes em 10000 g e 10 minutos, sendo que o “pellet” obtido foi mantido a -80°C para a realização da extração dos metabólitos.

4.2.8.2 Extração dos metabólitos celulares

Foram adicionados à cultura de células congeladas, metanol e clorofórmio (4 °C) na proporção de 2:1 (250 µL.célula⁻¹). Após 15 minutos em contato com os primeiros solventes, clorofórmio e água ultra pura foram adicionados nas amostras na proporção de 1:1 (250 µL.células⁻¹), homogeneizados em vórtex e transferidos para eppendorf de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 20 minutos á 4 °C . Neste momento a amostra apresentou três fases, a superior, aquosa (metanol e água), a do meio resto celular e a inferior a fase orgânica (clorofórmio), sendo que as fases, aquosa e orgânica foram separadas com auxílio de uma seringa de vidro. Os solventes foram removidos em temperatura ambiente sob pressão reduzida utilizando o equipamento speed vac. Os extratos contendo os metabólitos foram ressuspensos em 0,6 mL de tampão fosfato contendo d₄-trimetilsililpropionato de sódio (0.625 mmol.L⁻¹) em D₂O. As suspensões foram sonicadas, centrifugadas e os sobrenadantes transferidos para tubos de RMN (LE BELLE et al., 2002 modificado).

4.2.8.3 Experimentos de RMN

Os espectros foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA-500 ($B_0 = 11,7$ T) no campus do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS), operando a 500 MHz para ^1H , usando sonda tripla de ressonância (H, C, N) de 5 mm com detecção inversa. O sinal residual da água foi suprimido usando pulso seletivo de 90° , seguido por gradiente de campo pulsado no eixo z (wet1d). Cada experimento foi adquirido utilizando 256 transientes a 25°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e referenciados em relação ao d_4 -trimetilsililpropionato de sódio calibrado para 0 ppm, com auxílio do programa Spinworks 3. Por fim, os deslocamentos foram tratados no programa Origin 6.0, sendo que os resultados foram comparados e identificados posteriormente utilizando Ludenberg et al. (2005) e Govindaraju, Young e Maudsley (2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho foram apresentados na forma de artigos científicos.

O artigo intitulado “Estudo da produtividade da levana de *Bacillus subtilis* Natto por superfície de metodologia de resposta e sua atividade antitumoral contra células HepG2 usando abordagem metabolômica” está apresentado no Anexo A, submetido de acordo com as normas do periódico Bioresource Technology (Anexo C).

O artigo intitulado “Investigação dos efeitos da levana de *Bacillus subtilis* Natto como possível agente hipoglicemiante em ratos diabetogênicos induzidos por estreptozotocina” está apresentado no Anexo B, submetido de acordo com as normas do periódico Semina: Ciências Biológicas e da Saúde (Anexo D).

CONCLUSÕES

Na primeira etapa, foi obtido uma produtividade de levana igual a 4.8 g.L⁻¹.h⁻¹, porém a superfície de resposta ainda se encontrava na ascendente. Após o segundo delineamento, a otimização da produtividade de levana por *Bacillus subtilis* Natto foi alcançada, resultando no valor de 5,82 g.L⁻¹.h⁻¹, na condição de pH 8, 39,5°C, em 21 horas, na concentração de sacarose e a agitação fixados em 300 g.L⁻¹ e 100 rpm, sendo um dos maiores valores de levana reportado em literatura.

A levana produzida referente à esta condição de produtividade apresentou duas massas moleculares, uma alta igual a 4186 kDa (5%) e outra baixa igual a 72,37 kDa (95%), possibilitando maior versatilidade quanto suas aplicações.

A análise metabolômica das células HepG2 demonstrou uma alteração no perfil metabólico das mesmas, na qual a concentração da alanina, acetato, fosfocreatina e lactato aumentaram quando estas células receberam o tratamento com a levana, levando, provavelmente, a um quadro de hipóxia, principalmente pelo acúmulo elevado de lactato, o que provocaria uma queda do pH interno, desregulando a homeostase celular, alterando as principais vias de obtenção de energia, o que levaria estas células a morte, justificando, assim, sua atividade antitumoral.

A levana produzida e administrada nestas condições não proporcionou nenhuma melhora no quadro de diabetes dos animais durante o experimento, diferentemente do que era esperado. Não foi observado redução dos valores de glicose, colesterol e triacilglicerol plasmáticos, porém ela não interferiu no metabolismo de forma geral, atestando sua legitimidade como composto não tóxico, podendo ser utilizada para outros fins. Foram também observadas mudanças comportamentais nos ratos que receberam levana, porém são necessários estudos mais específicos que comprovem esta hipótese.

REFERENCIAS

ABDEL-FATTAH, A. F.; MAHMOUD, D. A. R.; ESAWY, M. A. T. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and Enzymic Synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. **Current Microbiology**, v. 51, p. 402 - 407, 2005.

AMMAR, Y. B.; MATSUBARA, T.; ITO, K.; IIZUKA, M.; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; MINAMIURA, N. 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.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 42, n. 3, p. 291 - 297, 1999a.

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

ARVIDSON, S. A.; RINEHART, B. T.; MARIA-GADALA, F. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p.144 - 149, 2006.

ASAI, M.; JUNG, C. B.; CHUNG, C. B. External preparation such as skin care cosmetics and sanitary material for preventing and treating rough skin and dry skin, contains levan and phosphorylcholine group-containing polymer as main ingredients. Toa Kaseikk. N.° JP2004339078-A, KR2004097902-A, KR584814-B1, JP3881323-B2, 2005.

ASANO, K. Preparation of difructose anhydride IV (DFA IV) from sugar, useful as functional food raw material, involves making levan fructo transferase gene to express to *Bacillus subtilis* which is levan producing microorganism. ASANO Y. N.° JP2008307010, 2008.

BABU, I. S.; MAHESH, D. G.; KUMARI, K. S.; KUMARI, K. S.; RANGAIAH, G. S. Optimization of medium constituents for the production of fructosyltransferase (Ftase) by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. **Research Journal of Microbiology**, v.3, n. 3, p. 114 - 121, 2008.

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.

BAJAD, S.; SHULAEV, V. Highly-parallel metabolomics approaches using LC-MS² for pharmaceutical and environmental analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 625 - 636, 2007.

BANIK, R. M.; SANTHIAGU, A.; UPADHYAY, S. N. Optimization of nutrients for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 in molasses medium using surface response methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 792 - 797, 2007.

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

BARROS, B.; SCARMINO, S. I.; BRUNS, E. R. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora Unicamp, 1995.

BARUD, H. S.; JUNIOR, A. M. A.; SANTOS, D. B.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MEIRELES, C. S.; CERQUEIRA, D. A.; FILHO, G. R.; RIBEIRO, C. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. **Thermochimica Acta.**, v. 471, p. 61 - 69, 2008.

BEKERS, M.; VIGANTS, A.; LAUKEVICS, J.; TOMA, M.; RAPOPORTS, A.; ZIKMANIS, P. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 147 - 150, 2000.

BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKEVICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, E.; UPITE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levan Ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 979 - 986, 2001.

BEINE, R.; MORARU, R.; NIMTZ, M.; NA'AMNIEH, S.; PAWLOWSKI, A.; BUCHHOLS, K.; SEIBEL, J. Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering. **Journal of Biotechnology**, v.138, p. 33 - 41, 2008.

BEZERRA, M. A., SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965 - 977, 2008.

BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 170 - 175, 2004.

BOELS, I. C.; VAN KRANENBURG, R.; HUGENHOLTZ, J.; KLEEREBEZEM, M.; VOS, W. M. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 723 - 732, 2001.

BOLKENT, S.; YANARDAG, R.; OGUS, A. T.; SAÇAN, O. O. Effects of chard extract on pancreatic B-cells in STZ-diabetic rats: a morphological and biochemical study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 27, p. 245 - 247, 2000.

BORSARI, R. R. J.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, [s/p], 2006.

BORSARI, R. R. J.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F.; CELLIGOI, M. A. P. C. Evaluation of supplementation of sucrose medium on the synthesis of *Zymomonas*

mobilis bio-products. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 229 - 233, 2010.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455 - 475, 1960.

BOX, G. E. P.; HUNTER, S. W.; HUNTER, J. S. **Statistic for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1978.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 21 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BURNS, M. A.; HE, W.; WU, C. L.; CHENG, L. L. Quantitative pathology in tissue MR spectroscopy based human prostate metabolomics. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 3, p. 591 - 598, 2004.

CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C.; FRANÇA, F. P. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 1, p. 19 - 21, 1997.

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

CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, 37,233-238, 2009 [PMID: 18838391].

CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of Safety of Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 268 - 282, 1999.

CAVALCANTI, O. A.; PETENUC, B.; BEDIN, A. C.; PINEDA, E. A. G.; HECHENLEITNER, A. A. W. Characterisation of ethylcellulose films containing natural polysaccharides by thermal analysis and FTIR spectroscopy. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 53 - 57, 2004.

CAZY - Carbohydrate-Active enZymes Database. Levansucrase. Disponível em:

<http://www.cazy.org/>. Acesso em: 12 de Dez, 2009.

CHAMBERT, R.; PETIT-GLATRON, M. F. Polymerase and hidrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. **Journal of Biochemical**, v. 279, p. 35 - 41, 1993.

CHEN, W.; ZHAO, Z.; CHEN, S. F.; LI, Y. Q. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3187 - 3194, 2008.

CHEN, X.; LIU, Y.; BAI, X.; WEN, L.; FANG, J.; YE, M.; CHEN, J. HYPOGLYCEMIC Polysaccharides from the Tuberous Root of *Liriope spicata*. **Journal of Natural Products**, v. 72, 1988 - 1992, 2009.

CHIANG, J-J.; CHAO, Y-P. Production of levan using immobilized levansucrase. **Abstracts / Journal of Biotechnology**, v.136S, p. S356–S401, 2008.

CHO, E. J.; HWANG, H. J.; KIM, S. W.; OH, J. Y.; BAEK, Y. M.; CHOI, J. W.; BAE, S. H.; YUN, J. W. Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelia cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* e *Phellinus baumii* in ob/ob mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 6, p.1257 - 1265, 2007.

COMBIE, J. Properties of levan and potentials medical uses. **Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications**, v. 934, p. 263 - 269, 2006.

COTE, G. L.; IMMAN, S. H. Purification and properties of an extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRLB-1678. **Carbohydrate**, v. 190, p. 299 - 307, 1989.

CUI, F. J.; TAO, W. Y.; XU, Z. H.; GUO, W. J.; XU, H. Y.; AO, Z. H.; JIN, J.; WEI, Y. Q. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b

from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 395 - 401, 2007.

DAVIS, C. D; MILNER, J. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. **Mutation Research**, v. 551, p. 51 - 64, 2004.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D.. Mass spectrometry-based

Metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**., v. 26, p. 51 - 78, 2007.

DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H.; DOELLE, M. B. *Zymomonas mobilis*-Science and Industrial Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 1, p.57 - 98, 1993.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Minnesota, v. 28, n. 3, p. 350 - 356, 1956.

EL-GAWAD, I. A. A.; EL-SAYED, E.M.; HAFEZ, S. A.; EL-ZENINI, H. M.; SALEH, F. A. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 37 - 44, 2005.

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 Biotechnology**, v. 25, p. 821 - 827, 2009.

- ERNANDES, F. M. P. G.; CRUZ, C. H. G. Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa. **Acta Scientiarum Technology**, v. 31, n. 1, p. 35 - 41, 2009.
- 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.
- FERELLA, F.; DI CELSO, G. M.; DE MICHELIS, I.; STANISCI, V.; VEGLIO, F. Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production. **Fuel**, v. 89, p. 36 - 42, 2010.
- FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modeling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics.**, v. 2, p. 155 - 168, 2001.
- FUSCONI, R.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; GUIMAÃES, R. M.; FILHO, G. R.; MACHADO, A. E. H. Exopolysaccharide produced by *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 in GYM commercial medium and sugarcane molasses alternative medium: FT-IR study and emulsifying activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 403 - 408, 2010.
- FURUKAWA, M.; TSUBOI, T. Skin whitening agent for use as melanin synthesis, tyrosinase activation and pigmentation inhibitors, for providing fairness to skin preventing/improving skin damage e.g. aging spots and sunburn contains levan. Ichimaru Pharcos Inc. N.ºJP2006052146-A, 2006.
- GATES, S. C.; SWEELEY, C. C. Qualitative metabolic profiling based on gas chromatography. **Clinical Chemistry**, v. 24, p.1663 - 1673, 1978.
- GHALY, A. E.; ARAB, F.; MAHMOUD, N. S.; HIGGINS, J. Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage structures. **American journal Biotechnology and Biochemistry**, v. 3, n. 2, p. 47 - 54, 2007.
- GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; DUNN, W. B.; HARRIGAN, G. G.; KELL, D. B. Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 245 - 252, 2004.
- GOLDMAN, D.; LAVID, N.; SCHWARTZ, A.; SHOHAM, G.; DANINO, D.; SHOHAM, Y. Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase an ordered microfibril structure of the enzyme promotes levan polymerization. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 283, p. 32209 - 32217, 2008.
- GOVINDARAJU, V.; YOUNG, K.; MAUDSLEY, A. A. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. **NMR in Biomedicine**, v. 13, p. 129 - 153, 2000.
- GREIG – SMITH, R. The gum fermentation of sugar cane juice. **Proceedings of the Linnaen Society of New South Wales**, v. 26, p. 589 - 625, 1901.
- GRIFFIN, J. L.; SHOCKCOR, J. P. Metabolic Profiles of Cancer Cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 551 - 561, 2004.

- GRIFFITHS, J. R. Opportunities for studying cancer by metabolomics: preliminary observations on tumors deficient in hypoxia-inducible factor 1. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 43, p. 67 - 76, 2003.
- GUPTA, S. K.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; DALVI, R.; KUMAR, V.; MUKHERJEE, S. C. Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 649 - 657, 2008.
- HAMCERENCU, M.; DESBRIERES, J.; POPA, M.; KHOUKH, A.; RIESS, G. New unsaturated derivatives of xanthan gum: Synthesis and characterization. **Polymer**, v. 48, p. 1921 - 1929, 2007.
- HAN, Y. W. Microbial Levan. **Advances In Applied Microbiology**, v. 35, p. 171 - 194, 1990.
- HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. production and characterization of microbial levan. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 393 - 396, 1990.
- HE, J.; ZHEN, Q.; QIU, N.; ZIDUO, L.; WANG, B.; SHAO, Z.; YU, Z. Medium optimization for the production of a novel bioflocculant from *Halomonas* sp. V3a' using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5922 - 5927, 2009.
- HIBBERT, H.; TIPSON, R. S. The structure of gum levan. **Pulp and Paper Research Institute**, v. 52, p. 25 - 82, 1930.
- HINES, A.; YEUNG, W. H.; CRAFT, J.; BROWN, M.; KENNEDY, J.; BIGNELL, J.; STENTIFORD, G. D.; VIANT, M. R. Comparison of histological, genetic, metabolomics, and lipid-based methods for sex determination in marine mussels. **Analytical Biochemistry**, v. 369, p.175 - 186, 2007.
- HOLMES, E.; WILSON, I. D.; NICHOLSON, J.K. Metabolic phenotyping in health and disease. **Cell**, v. 134, p. 714 - 717, 2008.
- HONG, H. A.; HUANG, J. M.; KHANEJA, R.; HIEP, L. V.; URDACI, M. C.; CUTTING, S. M. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 510 - 520, 2008.
- HOSOI, T.; HIROSE, R.; SAEGUSA, S.; AMETANI, A.; KIUCI, K.; KAMINOGAWA, S. Cytokine responses of human intestinal epithelial-like Caco-2 cells to the nonpathogenic bacterium *Bacillus subtilis* (natto). **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 255 - 264, 2003.
- HSU, M. F., CHIANG, B. H. Effect of *Bacillus subtilis* natto-fermented *Radix astragali* on collagen production in human skin fibroblasts. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 83 - 90, 2009.

HUBER, A. E.; STAYTON, P. S.; VINEY, C.; KAPLAN, D. L. Liquid crystallinity of a biological polysaccharide: the levan/water phase diagram. **Macromolecules**, v. 27, p. 953 - 957, 1994.

HWANG, H-J.; KIM, S-W.; LIM, J-M.; JOO, J-H.; KIM, H-O.; KIM, H-M.; YUNT, J-W. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v.76, p. 3069 - 3080, 2005.

JAE, O. L.; JEON, S. Y.; JI, H. K.; KYUNG, A. H. Functional levan fermented soybean paste powder preparation involves collecting powdered soup prepared from fermented soybean and making obtained soybean powder into liquid by inoculating *Bacillus natto* and is spray-dried. Real Biotech Coltd. N.° KR2009033937, 2009.

JEYARAM, K.; SINGH, W. M.; PREMARANI, T.; DEVI RANJITA, A.; SELINA CHANU, K.; TALUKDAR, N. C.; SINGH, R. M. Molecular identification of dominant microflora associated with 'Hawaijar'—a traditional fermented soybean (*Glycine max* (L.)) food of Manipur, India. **International Journal of Food and Microbiology**, v. 122, p. 259 - 268, 2008.

JORDAN, K. W.; TAM, J. N.; LAUWERS, G. Y.; ROTHENBERGER, D. A.; ALAVI, K.; GARWOOD, M.; CHENG, L. L. Metabolomic Characterization of Human Rectal Adenocarcinoma With Intact Tissue Magnetic Resonance Spectroscopy. **Diseases of Colon & Rectum**, v. 52, p. 520 - 525, 2009.

KADDURAH-DAOUK, R.; KRISTAL, B. S.; WEINSHILBOUM, R. M. Metabolomics: a global biochemical approach to drugresponse and disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 48, p. 653 - 683, 2008.

KANG, H. K.; SEO, M. Y.; SEO, E. S.; KIM, D.; CHUNG, S. Y.; KIMURA, A.; DAY, D. F.; ROBYT, J. F. Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1727, p. 5 - 15, 2005.

KANG, S-A. HONG, K.; JANG, K-H.; KIM, Y-Y; CHOUE, R.; LIM, Y. Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, p. 419 - 426, 2006.

KATINA, K.; MAINA, N.H.; JUVONEN, R.; FLANDER, L.; JOHANSSON, L.; VIRKKI, L.;TENKANEN, M.; LAITILA, A. In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. **Food Microbiology**, v. 26, p. 734 - 743, 2009.

KEITH, J.; WILEY, B.; BALL, D.; ARICIDIACONO, S.; ZORFASS, B.; MAYER, J.; KAPLAN, D. Continuous culture system for production of biopolymer levan

using *Erwinia herbicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 5, p. 557 - 560, 1991.

KENGATHARAN, K. M.; DE KIMPE, S.; ROBSON, C.; FOSTER, S. J.; THIEMERMANN, C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide

synthase, shock, and multiple organ failure. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 305 - 315, 1998.

KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: Fundamentals and applications. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 306 - 325, 2005.

KIKUCHI, H.; SAKURAI, H.; NAGURA, T.; ARITSUKA, T.; TOMITA, F.; YOKOTA, A. One-pot conversion of levan prepared from *Serratia levanicum* NN to difructose anhydride IV by *Arthrobacter nicotinovorans* levan fructotransferase. **Journal Bioscience Bioengineering**, [s/v.], [s/p.], 2009.

KIM, K. H.; CHUNG, C. B.; KIM, Y. H.; HAN, C. S.; KIM, C. H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Cosmetic Science**, v. 56, p. 395 - 406, 2005.

KIM, K.H.; CHUNG, C. B.; KIM, Y. H.; KIM, K. S.; HAN, C. S.; KIM, C. H. Levansucrase for producing levan for use in preparing drug, food and cosmetics, has amino acids sequence, given in specification. Korea Res Inst Bioscience e Biotechnology. N.° KR2009101130, 2009.

KOCZAN, J. M.; MCGRATH, M. J.; ZHAO, Y. F.; SUNDIN, G. W. Contribution of *Erwinia amylovora* Exopolysaccharides Amylovoran and Levan to Biofilm Formation: Implications in Pathogenicity. **Phytopathology**, v. 99, p. 1237 - 1244, 2009.

KUSSMANN, M.; RAYMOND, F.; AFFOLTER, M. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. **Journal of Biotechnology**, v.124, p. 758 - 787, 2006.

LANZA, I. R.; ZHANG, S.; WARD, L. E.; KARAKELIDES, H.; RAFTERY, D.; NAIR, K. S. Quantitative Metabolomics by 1H-NMR and LC-MS/MS Confirms Altered Metabolic Pathways in Diabetes. **Metabolomics in Diabetes**, v.5, p. 1 - 10, 2010.

LAWS, A.; GU, Y.; MARSHALL, V. Biosynthesis, characterization and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 597 - 625, 2001.

LE BELLE, J. E.; HARRIS, N. G.; WILLIAMS, S. R.; BHAKOO, K. K. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy. **NMR Biomedicine**, v.15, p. 37 - 44, 2002.

LEGNANI, C.; VILANI, C.; CALIL, V. L.; BARUD, H. S.; QUIRINO, W. G.; ACHETE, C. A.; RIBEIRO, S. L. J.; CREMONA, M. Bacterial cellulose membrane as flexible substrate for organic light emitting devices. **Thin Solid Films**, v. 517, p. 1016 - 1020, 2008.

LI, S. P.; ZHANG, G. H.; ZENG, Q.; HUANG, Z. G.; WANGS, Y. T.; DONG, T. T. X.; TSIM, K. W. K. Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps* mycelia. **Phytomedicine**, v. 13, p. 428 - 433, 2006.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; EVERETT, J. R. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. **Concepts in Magnetic Resonance**, v. 12, p. 289 - 320, 2000.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. **Expert Reviews of Molecular Diagnostics**. v. 4, n. 2, p.189 - 199, 2004.

LIU, J.; ZHANG, J. XIA, W. Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, v. 107, p. 419 - 425, 2008.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X. Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 206 - 213, 2010.

LOOIJESTEIJN, P. J.; TRAPET, L.; DE VRIES, E.; ABEE, T.; HUGENHOLTZ, J. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 71 - 80, 2001.

LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M. M. M.; CARLOS, T. F. On the effect of temperature and pH on the setting behavior of a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 43 - 46, 1991.

LUTZ, N. W. Contributions of metabol(om)ic NMR spectroscopy to the investigation of apoptosis. **Comptes Rendus Chimie**, v. 9, p. 445 - 451, 2006.

LUNDBERG, P.; VOGEL, T.; MALUSEK, A.; LUNDQUIST, P-O.; COHEN, L.; DAHLQVIST, O. MDL - The Magnetic Resonance Metabolomics Database (mdl.imv.liu.se), ESMRMB, Basel, Switzerland, 2005.

LYNESS, E. W.; DOELLE, H. W. Fermentation pattern of sucrose of ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strain. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1449 - 1460, 1981.

LYNESS, E. W., DOELLE, H. W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 5, n° 5, p. 345 - 350, 1983.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 11th ed. Prentice Hall, 2005.

MADIEDO, P. R.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acidbacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163 - 171, 2002.

MAKINO, Y. Novel *Bacillus natto* mutant having half or less than half of levan degradation activity as that of parent strain, useful for producing fermented soybean with high content of levan. Mitsukan Group Honshakk. N.° JP2006115815, 2006.

MAKINO, Y., OGAWA, S. Novel *Bacillus natto* mutant having decreased levan degradation enzyme activity in comparison with parent strain, useful for producing natto having high content of levan. Mitsukan Group Honshakk. N.° JP2007000007, 2007.

- MANANDHAR, S.; VIDHATE, S.; D'SOUZA, N. Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 78 p. 794 - 798, 2009.
- MARTÍNEZ-FLEITES, C.; ORTÍZ-LOMBARDÍA, M.; PONS, T.; TARBOURIECH, N.; TAYLOR, E. J.; ARRIETA, J. G.; HERNÁNDEZ, L.; DAVIES, G. J. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biochemical Journal**, n. 390, p. 19 - 27, 2005.
- MCINTOSH, M.; STONE, B. A.; STANISICH, V. A. Curdlan and other bacterial (1-3)-b-D-glucans. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 68, p.163 - 173, 2005.
- MELO, I. R.; PIMENTEL, M. F.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 45 - 51, 2007.
- MELO, F. C. B. C. **Avaliação da produção de levana por *Bacillus subtilis* ATCC6633 em diferentes condições de cultivo utilizando caldo de cana-de-açúcar**. 2009. 50p. Monografia de graduação em Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.
- MENG, G.; FÜTTERER, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. **Nature Structural Biology**, v. 10, p. 953 - 941, 2003.
- MIRANDA, C. C. B. O. **Produção de botriosferana e avaliação de suas atividades mutagênica, antimutagênica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica**. Londrina: UEL, 2006, 185p. Dissertação do programa de mestrado em Biotecnologia – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina.
- MONSAN, P.; BOZONNET, S.; ALBENNE, C.; JOUCLA, G.; WILLWMOT, R-M; REMAUD-SIMÉON, M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 675 - 685, 2001.
- MORALES-ARIETA, S.; RODRÍGUEZ, M. E.; SEGOVIA, L.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; OLVERA-CARRANZA, C. Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. **Gene**, v. 376, p. 59 - 67, 2006.
- MUÑOZ-GUTIÉRREZ, I.; RODRIGUEZ-ALEGRÍA, M.; MUNGUÍA, A. L. Kinetic behaviour and specificity of b-fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 891 - 898, 2009.
- MURALIDHARAN, J.; JAYACHANDRAN, S. Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 841 - 847, 2003.
- MURO, A. C.; RODRIGUEZ, E.; ABATE, C. M.; SENERIZ, F. Levan production using mutants strains of *Zymomonas mobilis* in different cultura conditions. **Byotechnology 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.

NEWBRUN, E.; BAKER, S. Physico-chemical characteristics of the levan produced by *Streptococcus salivarius*. **Carbohydrate Research**, v. 6, p. 165 - 170, 1968.

NEWBRUN, E., LACY, R., CHRISTIE, T. The morphology and size of the extracellular polysaccharide from oral streptococci. **Archives of Oral Biology**, v.16, p. 862 - 872, 1971.

NOMURA, T.; SAIKAWA, A.; MORITA, S.; NE KAKUTANI, T. S.; YAMASHITA, F.; HONDA, K.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Pharmacokinetic characteristics and therapeutic effects of mitomycin C-dextran conjugates after intratumoural injection. **Journal of Controlled Release**, v. 52, p. 239 - 252, 1998.

OGGIONI, M. R.; POZZI, G.; VALENSIN, P. E. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 325 - 326, 1998.

OH, I-K.; YOO, S-H; BAE, I. Y.; CHA, J.; LEE, H. G. Effects of *Microbacterium laevaniformans* Levans Molecular Weight on Citotoxicity. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, n° 5, p. 985 - 990, 2004.

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

OLVERA, C., CENTENO-LEIJA, S. LOPEZ-MUNGUÍA, A. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 92, p. 11 - 20, 2007.

PAULA, V. C.; PINHEIRO, I. O.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T. Microwave-assisted hydrolysis of *Zymomonas mobilis* levan envisaging oligofructan production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2466 - 2470, 2008.

PEARS, M. R.; COOPER, J. D. MITCHISON, H. M.; MORTISHIRE-SMITH, R. J.; PEARCE, D. A.; GRIFFIN, J. L. High Resolution 1H NMR-based Metabolomics Indicates a Neurotransmitter Cycling Deficit in Cerebral Tissue from a Mouse Model of Batten Disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p.42508 - 42514, 2005.

PENG, Y.; ZHANG, L.; ZENG, F.; KENNEDY, J. F. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 385 - 392, 2005.

PHROMRAKSA, P.; NAGANO, H.; BOONMARS, T.; KAMBOONRUANG, C. Identification of proteolytic bacteria from Thai traditional fermented foods and their allergenic reducing potentials. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 189 - 195, 2008.

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.

- PRAKASH, O.; TALAT, M.; HASAN, S. H.; PANDEY, R. K. Factorial design for the optimization of enzymatic detection of cadmium in aqueous solution using immobilized urease from vegetable waste. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7565 - 7572, 2008.
- PRAKASH, O.; TALAT, M.; HASAN, S. H. Response surface design for the optimization of enzymatic detection of mercury in aqueous solution using immobilized urease from vegetable waste. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 265 - 271, 2009.
- QUINONES, M. P.; KADDURAH-DAOUK, R. Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 35, p.165 - 176, 2009.
- RAIRAKHWADA, D.; PAL, A. K.; BHATHENA, Z. P.; SAHU, N. P.; JHA, A.; MUKHERJEE, S. C. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 477 - 486, 2007.
- REMMINGHORST, U.; REHM, B. H. A. Bacterial alginates: From biosynthesis to applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1701 - 1712, 2006.
- RHEE, S-K.; SONG, K-B.; KIM, C-H.; PARK, B-S. JANG, E-K.; JANG, K-H. Levan. In A. Steinbüchel (Ed.), *Biopolymers; polysaccharides I*. New York/Weinheim: Wiley/VCH, 2002. p. 351 - 377
- ROBERTS, I. S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 50, p. 285 - 315, 1996.
- RYAN, K. J.; RAY C. G. **Sherris Medical Microbiology**. 4th ed. McGraw Hill, 2004.
- SANGILYANDI, G.; RAJ, K. C.; GUNASEKARAN, P. Elevated temperature and chemical modifications selectively abolishes levan forming of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 21, p.179 - 182, 1999.
- SAUDE, N.; JUNTER, G. A. Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter inelandii*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 895 - 900, 2002.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1 - 17, 2004.
- SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, M.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 585 - 592, 2002.
- SERVIOUR, R. J. *et al.* Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, p. 279 - 298, 1992.

- SHIEH, C. J.; THI, L. A. P.; SHIH, I. L. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 85 - 91, 2009.
- 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.
- SHIH, I. L., YU, Y. T. Simultaneous and selective production of levan and poly(ζ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 103 - 106, 2005.
- SHIH, I.; YOU, Y. A method for the production of levan by *Bacillus natto* - forms the levan by linking fructose molecules with beta fructofuranosyl glycoside and improves the production efficiency of levan. BIO INVIGOR CORP. N.° TW200613549-A, 2009.
- 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.
- SHU, C. H.; LUNG, M. Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 931 - 937, 2004.
- SILVEIRA, S. T.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. **LWT – Food, Science and Technology**, v. 41, p. 170 - 174, 2008.
- SIMMS, P.; BOYKO, W.; EDWARDS, J. The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. **Carbohydrate Research**, v. 208, p. 193 - 198, 1990.
- SINGH, R. S., GAGANPREET, K. S., KENNEDY, J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 515 - 531, 2008.
- SLIM, R. M.; ROBERTSON, D. G.; ALBASSAM, M.; REILY, M. D.; ROBOSKY, L.; DETHLOFF, L. A. Effect of dexamethasone on the metabonomics profile associated with phosphodiesterase inhibitor-induced vascular lesions in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 183, p. 108 - 116, 2002.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 160, p 61 - 68, 1952.
- SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**. v. 16, p. 41 - 46, 1998.
- TANAKA, Y.; HIGASHI, T.; RAKWAL, R.; WAKIDA, S.; IWAHASHI, H. Quantitative analysis of sulfur-related metabolites during cadmium stress response in yeast by capillary electrophoresis–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 608 - 613, 2007.
- TAKESUE, N.; SONE, T.; TANAKA, M.; TOMITA, F., ASANO, K. Effect of an additionally introduced degQ gene on di-D-fructofuranosyl 2,6:2,6 anhydride (DFA IV) production by recombinant *Bacillus subtilis* in a single culture production system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n° 6, p. 623 - 629, 2009.

ter KUILE, B. H.; WESTERHOFF, H. V. Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. **FEBS Letters**, v. 500, p. 169 - 171, 2001.

TIEKING, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F.; GÄNZLE, M. G. Molecular and functional characterization of a levansucrase from sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 655 - 663, 2005.

TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L.; JIANG, R.; TIAN, D.; SUN, X. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1682 - 1686, 2009.

TONG, H.; LIANG, Z.; WANG, G. Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 316 - 323, 2008.

TZANG, B. S.; YANG, S. F.; FU, S. G.; YANG, H. G.; SUN, H. L.; CHEN, Y. C. Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. **Food Chemistry**, v. 140, p. 1450 - 1455, 2009.

UEMENE, K.; OOHASHI, S.; YAMANAKA, F.; SHIRAISHI, A. Molecular characterization of the genome of *Bacillus subtilis* (natto) bacteriophage PM1, a phage associated with disruption of food production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1877 - 1881, 2009.

van HIJUM, S.A. F. T.; KRALJ, S.; OZIMEK, L. K.; DIJKHUIZEN, L.; van GEEL – SCHUTTEN, I. G. H. Structural function relationships of glucansucrases and fructan enzymes from lactic acid bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 157 - 176, 2006.

van der WERF, M. J.; JELLEMA, R. H.; HANKEMEIER, T. Microbial metabolomics: Replacing trial-and-error by the unbiased selection and

ranking of targets. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p. 234 - 252, 2005.

VIGNOLI, J. A., CELLIGOI, M. A. P. C., SILVA, R. S. F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrical*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 240 - 243, 2005.

VIGNOLI, J. A.; CAZETTA, M. L.; SILVA, R. S. S.; CELLIGOI, M. A. P. C. Influence of High Osmotic Pressure on Sorbitol Production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1169 - 1175, 2010.

VIZÁN, P.; MAZUREK, S.; CASCANTE, M. Robust metabolic adaptation underlying tumor progression. **Metabolomics**, v. 4, p. 1 - 12, 2008.

XU, Q. Y.; TOSHIKAI, Y. Composition for preventing and treating allergic diseases such as bronchial asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis and pollinosis, contains levan as active ingredient. Mitsukan Group Honsha KK. N.° JP2006001922-A, 2006.

WANG, C. L.; NG, T. B.; YUAN, F.; LIU, Z. K.; LIU, F. Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cyclic lipopeptide from *Bacillus subtilis* natto T-2. **Peptides**, v. 28, p. 1344 - 1350, 2007.

WENDT, R. **Estudo da produção de levana através de *Zymomonas mobilis***. Campinas : UNICAMP, 2001, 76p. Dissertação do mestrado em Engenharia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

WILSON, D. M., BURLINGAME, A. L.; CRONHOLM, T.; SJÖVALL, J. Deuterium and carbon-13 tracer studies of ethanol metabolism in the rat by ^2H , ^1H -decoupled ^{13}C nuclear magnetic resonance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 56, p. 828 - 835, 1974.

WISHART, D. S. Applications of metabolomics in drug discovery and development. **Drugs R & D**, v. 9. nº 5, p. 307 - 322, 2008a.

WISHART, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, nº. 3, p. 228 - 237, 2008b.

WU, H.; XUE, R.; LU, C.; DENG, C.; LIU, T.; ZENG, H.; WANG, Q.; SHEN, X. High-throughput tissue extraction protocol for NMR and MS-based metabolomics. **Analytical Biochemistry**, v. 372, p. 204 - 212, 2008.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y.; KAWANO, M.; IIZUKA, M.; MATSUMOTO, T.; SAEKI, S.; YAMAGUCHI, H. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p.13 -18, 1999.

YAO, H-T., HUANG, S-Y., CHIANG, M-T. A comparative study on hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of high and low molecular weight chitosan in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.1525 - 1534, 2008.

YING-CHUNG JIAO, Y-C.; CHEN, ZHOU, J.-S.; ZHANG, H-F.; CHEN, H-Y. Improvement of exo-polysaccharides production and modeling kinetics by *Armillaria luteo-virens* Sacc. in submerged cultivation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 1694 - 1700, 2008.

YOO, S. H.; YOON, E. J.; CHA, J.; LEE, H. G. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34 p. 37 - 41, 2004.

YOON, E. J.; YOO, S. H.; CHA, J.; LEE, H. G. Effect of levan's branching structure on antitumor activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 191 - 194, 2004.

ZEISEL, S. H.; FREAKE, H. C.; BAUMAN, D. E.; BIER, D. M.; BURRIN, D. G.; GERMAN, J. B.; KLEIN, S. MARQUIS, G. S.; MILNER, J. A.; PELTO, G. H.; RASMUSSEN, K. M. The nutritional phenotype in the age of metabolomics. **Journal of Nutrition**, v. 135, p.1613 - 1616, 2005.

ZHANG, R.; ZHOU, J.; JIA, Z.; ZHANG, Y.; GU, G. Hypoglycemic effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide in hyperglycemic and alloxan-induced diabetic rats and its mechanism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 39 - 43, 2004.

ZHANG, X.; LIU, J.; QIAO, H.; LIU, H.; NI, J.; ZHANG, W.; SHI, Y. Formulation optimization of dihydroartemisinin nanostructured lipid carrier using response surface methodology. **Powder Technology**, v. 197, p.120 - 128, 2010.

ZOU, S.; ZHANG, X.; YAO, W.; NIU, Y.; GAO, X. Structure characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. **Carbohydrate Polymer**, In Press, 2010.

ZULAK, K. G.; WELJIE, A. M.; VOGEL, H. J.; FACCHINI, P. J. Quantitative ¹H NMR metabolomics reveals extensive metabolic reprogramming of primary and secondary metabolism in elicitor-treated opium poppy cell cultures. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 5, p. 1 - 19, 2008.

ANEXOS

ANEXO A**ESTUDO DA PRODUTIVIDADE DA LEVANA DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO
POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E SUA ATIVIDADE
ANTITUMORAL CONTRA CÉLULAS HEPG2 USANDO ABORDAGEM
METABOLÔMICA**

**Fernando Cesar Bazani Cabral de Melo; Dionísio Borsato; Fernando César de
Macedo Júnior; Mario Sérgio Mantovani; Maria Antonia Pedrine Colabone
Celligoi***

**ESTUDO DA PRODUTIVIDADE DA LEVANA DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO
POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E SUA ATIVIDADE
ANTITUMORAL CONTRA CÉLULAS HEPG2 USANDO ABORDAGEM
METABOLÔMICA**

**Fernando Cesar Bazani Cabral de Melo¹; Dionísio Borsato²; Fernando César de
Macedo Júnior²; Mario Sérgio Mantovani³; Maria Antonia Pedrine Colabone
Celligoi^{1*}**

Abstract

Levan productivity of *Bacillus subtilis* Natto was evaluated in submerged culture varying the pH, temperature and culture time, using factorial design and response surface methodology. The characterization of levan molecular weight was performed by HPSEC and its antitumor activity against HepG2 cells using metabolomic approach was also evaluated. At first, the variables investigated, as well as their interactions, demonstrated significant effect. Further, a second design using the same variables at different levels was developed. Thus, according to the model, an optimized value corresponding to $5.82 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ was achieved at pH 8, $39.5 \text{ }^\circ\text{C}$ in 21 hours, the highest value reported so far. After analysis by HPSEC, two molecular weights were obtained corresponding to 72.37 and 4146 kDa. The levan promoted an increase of acetate, alanine, lactate and phosphocreatine in HepG2 cells suggesting an alteration in the bioenergetics pathways and cellular homeostasis by intracellular accumulation of lactate, justifying its antitumor activity.

Key words: Levan. *Bacillus subtilis* Natto. Antitumor activity.

1 INTRODUÇÃO

Muitos polissacarídeos vêm recebendo atenção ultimamente por apresentarem potencial atividade antitumoral. Uma série de trabalhos envolvendo polissacarídeos bacterianos (Takeuchi et al., 2009; Zhao et al., 2010), fúngicos

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, State University of Londrina, SC 86051-990 Londrina, Brazil. *Corresponding author. Tel.: +55 43 33714270. E-mail address: macelligoi@uel.br

²Department of Chemistry, Centre of Exact Science, State University of Londrina, SC 86051-990 Londrina, Brazil

³Department of General Biology, Centre of Biological Science, State University of Londrina, SC 86051-990 Londrina, Brazil

(Chen et al., 2008; Tong et al., 2009) e vegetais (Cao e Ikeda, 2009; Rui et al., 2010) têm demonstrado resultados expressivos contra células cancerosas *in vivo* e *in vitro*.

A levana, um exopolissacarídeo constituído de unidades de frutose unidas por ligações do tipo β -(2→6) e ramificações β -(2→1) (Han e Clarke, 1990), sintetizada pela enzima levanasacarase (EC 2.4.1.10) em meio com concentrações elevadas de açúcares (Meng e Fütterer, 2003), também tem sido estudada pela ação antitumoral. Alguns trabalhos já reportaram sua atividade contra sarcoma 180 e carcinoma Ehrlich *in vivo* (Calazans et al., 1997; Calazans et al., 2000); também contra carcinoma gástrico (SNU-1) e carcinoma hepatocelular (HepG2) humano *in vitro* (Oh et al., 2004; Yoo et al., 2004; Yoon et al., 2004) utilizando levanas com diferentes massas molares e graus de ramificação.

A análise da atividade antitumoral de uma substância pode ser estudada pela metabolômica, uma ciência que estuda o conteúdo metabólico de uma célula ou de um organismo em um determinado tempo (Griffiths, 2003) refletindo o real estado fisiológico de um material biológico (Goodacre et al., 2004). Podendo, assim, contribuir no desenvolvimento de diagnósticos de doenças (Kussmann et al. 2006); estudos sobre toxicidade e metabolismo de fármacos (Keun, 2006); mapas metabólicos tumorais (Vizán et al., 2008), entre outros.

A ressonância magnética nuclear (NMR) pode ser usada para analisar o conteúdo metabólico originado de tecidos, células ou de seus extratos (Srivastava e Govil, 2001), monitorar alterações nos perfis metabólicos em resposta a um estresse químico, como a administração de compostos biologicamente ativos (Harrigan et al., 2005).

Dentre os microrganismos capazes de sintetizar a levana destaca-se o *Bacillus subtilis* Natto, que é utilizado na fermentação do alimento japonês natto, e tem demonstrado grande potencial na conversão de sacarose em levana (Shih et al., 2005; Shih et al., 2010).

Para obter alta produção de levana é importante verificar os fatores que influenciam no processo, como a concentração da fonte de carbono do meio (Melo et al., 2007; Shih et al., 2010), a temperatura, (Abdel-Fattah et al., 2005; Euzenat et al., 1997) tempo de cultivo (El-Refai et al., 2009; Oliveira et al., 2007) e o pH (Shih et al., 2005; Shih et al., 2010). Para estudar de forma integrada estes fatores o uso do planejamento estatístico é importante, pois reduz o número de

experimentos (Box e Behnken, 1960), melhora a qualidade das informações dos resultados obtidos, diminuindo o tempo e o custo ao final do processo. Aliada ao planejamento estatístico, a técnica de metodologia de superfície de resposta também colabora para minimizar o empirismo da teoria de tentativa e erro, fornecendo dados confiáveis sobre o processo (Barros et al., 1995).

O objetivo deste trabalho foi estudar a produtividade de levana por *Bacillus subtilis* Natto usando metodologia de superfície de resposta e investigar sua atividade antitumoral sob o carcinoma hepatocelular (HepG2) por análise metabômica.

2 MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO E MEIOS DE CULTIVO

O microrganismo utilizado foi o *Bacillus subtilis* Natto, isolado do alimento japonês Natto pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia e identificado pela Coleção de Culturas Tropicais – Fundação André Tosello - Campinas - SP – Brasil. Preservado no meio contendo em (g.L⁻¹): peptona 50, extrato de carne 30 e ágar 20 e mantida em câmara fria (4°C), sendo renovada a cada 45 dias. O meio de pré inoculo foi constituído em (g.L⁻¹): sacarose 100; extrato de levedura 2; KH₂PO₄ 2 ; (NH₄)₂SO₄ 1; MgSO₄.7H₂O 0,5 em 1 L de água destilada (Calazans et al., 2000). O meio para as fermentações em (g.L⁻¹): sacarose 300, extrato de levedura 2, KH₂PO₄ 1, (NH₄)₂SO₄ 3, MgSO₄.7H₂O 0,6, MnSO₄ 0,2 e Citrato de Amônio 0,25 em 1 L de água destilada (Euzenat et al.,1997, modificado).

2.2 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Para identificar as condições de cultivo que possam interferir na produção de levana, foi empregado, primeiramente, um planejamento fatorial Box e Behnken (1960), com 15 ensaios e 3 repetições no ponto central, com as seguintes variáveis: (X₁) pH 5, 6 e 7; (X₂) temperatura 25, 31 e 37°C e (X₃) tempo em 12, 18 e 24 horas. Os níveis de variações decodificados estão listados na Tabela 1. A concentração de sacarose e a agitação foram fixadas em 300 g.L⁻¹ e 100 rpm, de acordo com resultados obtidos de testes anteriores.

Tabela 1 – Delineamento fatorial Box – Behnken (3^3) para avaliar os efeitos do pH, temperatura e tempo na produtividade de levana (Y_1) de *Bacillus subtilis* Natto em 300 g.L^{-1} de sacarose a 100 rpm.

Ensaio	Variáveis codificadas			$Y_1 (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$	
	X_1	X_2	X_3	Experimental	Previsto
1	-1	-1	0	0.35	0.49
2	1	-1	0	0.51	0.55
3	-1	1	0	0.48	0.43
4	1	1	0	4.80	4.65
5	-1	0	-1	0.88	1.03
6	1	0	-1	1.19	1.44
7	-1	0	1	0.39	0.13
8	1	0	1	4.15	3.99
9	0	-1	-1	1.02	0.73
10	0	1	-1	1.96	1.85
11	0	-1	1	0.54	0.65
12	0	1	1	3.29	3.58
13	0	0	0	0.66	0.78
14	0	0	0	0.83	0.78
15	0	0	0	0.86	0.78

Fatores		Níveis reais		
		-1	0	1
X_1	pH	5	6	7
X_2	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	31	37
X_3	Tempo (horas)	12	18	24

Com base nos resultados desse delineamento, um segundo planejamento Box e Behnken (1960) foi proposto, as variáveis foram mantidas, porém seus valores foram modificados e correspondem a: (X_1) pH 7, 8 e 9, (X_2) temperatura 32, 37 e 42°C e (X_3) tempo 18, 24 e 30 horas, podem ser observados na Tabela 2. A concentração de sacarose e a agitação foram fixadas em 300 g.L^{-1} e 100 rpm. A resposta analisada foi a produtividade de levana g.L^{-1} (Y_1).

Tabela 2 – Segundo delineamento fatorial Box – Benhken (3^3) para a máxima produtividade de levana (Y_1) por *Bacillus subtilis* Natto em 300 g.L⁻¹ de sacarose a 100 rpm.

Ensaio	Variáveis codificadas			Y_1 (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	
	X_1	X_2	X_3	Experimental	Previsto
1	-1	-1	0	2,30	2,85
2	1	-1	0	2,26	2,98
3	-1	1	0	4,10	3,38
4	1	1	0	4,90	4,35
5	-1	0	-1	3,80	3,72
6	1	0	-1	4,69	4,43
7	-1	0	1	2,47	2,73
8	1	0	1	3,04	3,12
9	0	-1	-1	4,26	3,79
10	0	1	-1	4,89	5,69
11	0	-1	1	4,40	3,60
12	0	1	1	3,12	3,59
13	0	0	0	5,54	5,57
14	0	0	0	5,78	5,57
15	0	0	0	5,38	5,57

Fatores	Níveis reais			
		-1	0	1
X_1	pH	7	8	9
X_2	Temperatura (°C)	32	37	42
X_3	Tempo (horas)	18	24	30

As respostas referentes às produtividades de levana (Y_1) obtida dos planejamentos estatísticos (Tabela 1 e 2), foram analisadas pelo programa STATISTICA 7.0, para análise de variância com índice de confiança de 0,05 e metodologia de superfície de resposta.

2.3 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA LEVANA

O inóculo foi obtido por fermentação batelada em 25 mL do meio de pré – inóculo, durante 48 horas a 37 °C. Após esse tempo de cultivo, o meio foi centrifugado as células foram ressuspensas asepticamente em solução salina (NaCl a 0,9g/%) e medidas em 605 nm. O inóculo foi padronizado em 0,2 g.L⁻¹ de células.

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio de fermentação de acordo com o planejamento estatístico. A separação do sobrenadante da biomassa foi realizada por centrifugação a 9056g por 15 minutos a 4°C.

A levana foi precipitada do sobrenadante com etanol 90% a 4 °C na proporção de 3:1 (etanol: sobrenadante). Posteriormente foi centrifugada a 21382g por 20 minutos a 4 °C. A levana precipitada foi lavada em 3 volumes de etanol 90% gelado e centrifugado novamente. A levana foi hidrolisada com 1 mL de HCl 1N por uma hora a 100°C, resfriada e neutralizada com 0,1 mL de NaOH 2N (Ananthalakshmy e Gunasekaran, 1999, modificado). A concentração de levana foi estimada por meio de açúcares redutores (Nelson, 1944; Somogyi, 1952), utilizando glicose como padrão, em concentrações de 0 a 100 µg.ml⁻¹. As leituras das absorvâncias foram realizadas em $\lambda = 540$ nm.

2.4 MASSA MOLAR DA LEVANA

Para definir a massa molar, a levana foi dialisada contra água corrente e água deionizada, liofilizada e determinada por cromatografia exclusão molecular de alta performance. Foi utilizado o aparelho HPSEC (Waters, MA, USA), acoplado a um refratômetro diferencial (RID) a ao laser de dispersão de luz multi-angular (Dawn-F, Tecnologia Wyatt, Santa Barbara, CA, USA), para testar a levana (0,2% (w/v) em H₂O). Foram utilizadas quatro colunas Waters, Ultrahidrogel 2000/500/250/120, conectadas em série e acopladas aos detectores de índice de refração e ao MALLS. Como solvente foi utilizado uma solução de NaNO₃ 0,1M contendo NaN₃ (0,5 g.L⁻¹).

2.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA LEVANA

A linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivada em meio de cultura líquido DMEM (Sigma Aldrich, Inc.), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂, na concentração de 1 x 10⁷ células no Laboratório de Genética Toxicológica do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina. O meio foi renovado a cada dois dias até as células atingirem a confluência. Após este período, a levana obtida da melhor condição de cultivo foi administrada no meio de cultura em frascos de cultivo com 175 cm³.

As culturas celulares foram incubadas, em triplicata, com levana ou tampão fosfato salino (PBS) na concentração de 1000 µg.mL⁻¹, esta concentração foi testada considerando a ausência de citotoxicidade e mutagenicidade, a partir de resultados preliminares e de acordo com Yoo et al (2004). A levana foi, então, aplicada no tratamento por 48 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Após o tratamento, as células foram removidas da parede dos frascos adicionando 1,5 mL de solução de tripsina 0,025% (Invitrogen). A tripsina foi então inativada com adição de 5 mL de PBS em meio DMEM. A suspensão celular foi gentilmente pipetada em eppendorf e centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" foi ressuspensionado em PBS. A suspensão foi novamente centrifugada e o pelete foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a - 80 °C.

2.6 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS

Foram adicionados à cultura de células congeladas metanol e clorofórmio (4°C) na proporção de 2:1 (250 uL.célula⁻¹) (Le Belle et al., 2002). Após 15 minutos em contato com os primeiros solventes, clorofórmio e água ultra pura foram adicionados nas amostras na proporção de 1:1 (250 uL.células⁻¹), homogeneizados em vórtex e transferidos para eppendorf de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a 12000g por 20 minutos á 4°C . Neste momento a amostra apresentou três fases, a superior (aquosa - metanol e água), a do meio resto celular e a inferior (fase orgânica - clorofórmio), sendo que as fases, aquosa e orgânica, foram separadas com auxílio de uma seringa de vidro. Os solventes foram removidos em temperatura ambiente sob pressão reduzida utilizando o equipamento

speed vac. Os extratos contendo os metabólitos foram ressuspensos em 0,6 mL de tampão fosfato contendo d_4 -trimetilsililpropionato de sódio ($0.625 \text{ mmol.L}^{-1}$) em D_2O . As suspensões foram sonicadas e os sobrenadantes transferidos para tubos de RMN.

2.7 ESPECTROSCOPIA DE $^1\text{H-NMR}$

Os espectros foram adquiridos em espectrômetro Varian INOVA-500 ($B_0 = 11,7 \text{ T}$) no campus do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), operando a 500 MHz para ^1H , usando sonda tripla de ressonância (H, C, N) de 5 mm com detecção inversa. O sinal residual da água foi suprimido usando pulso seletivo de 90° , seguido por gradiente de campo pulsado no eixo z (wet1d). Cada experimento foi adquirido utilizando 256 transientes a 25°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e referenciados em relação ao d_4 -trimetilsililpropionato de sódio calibrado para 0 ppm. Por fim, os deslocamentos foram tratados no programa Oringin 6.0, sendo que os resultados foram comparados e identificados posteriormente utilizando o Magnetic Resonance Metabolomics Database (Lundberg et al., 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DE LEVANA

Um dos fatores que mais interferem na produção de levana é a fonte de carbono e sua concentração, sendo que a sacarose apresenta o melhor desempenho no processo (El-Refai et al., 2009; Shih et al., 2005). Com base em dados preliminares, a sacarose apresentou efeito positivo e significativo ($p = 0.035$), na concentração de 300 g.L^{-1} em agitação 100 rpm para *B. subtilis* Natto. Sendo assim, estas condições foram utilizadas neste trabalho. Para obter a melhor produtividade de levana por *B. subtilis* Natto, primeiramente foi desenvolvido um delineamento fatorial Box e Behnken (1960) com 15 experimentos e 3 repetições no ponto central, para avaliar a influência das variáveis (X_1) pH, (X_2) temperatura e (X_3) tempo (Tabela 1), mantendo a concentração de sacarose e agitação nas condições pré definidas.

Os resultados obtidos através da análise de variância apontaram que todas as variáveis estudadas apresentaram efeito significativo ($p = 0,05$) e positivo nos termos lineares e nas interações, enquanto que os termos quadráticos apresentaram efeito negativo. O pH (X_1) e a temperatura (X_2) foram as variáveis que mais influenciaram no processo ($p = 0,01$), bem como a interação entre ambas ($p = 0,02$). Shih et al. (2005) e Shih et al. (2010) demonstraram que o pH interfere diretamente na produção de levana. Abdel-Fattah et al. (2005) estudaram o efeito da temperatura na produção de levana e observaram que esta também contribui significativamente para na formação de levana.

Os resultados demonstraram que a intercepção foi significativa ($p = 0,007$) indicando que a escolha do ponto central (pH 6, 31 °C e 18 horas) foi correta. Através da análise de múltipla regressão, a equação polinomial de segunda ordem foi obtida e é dada a seguir:

$$Y_1 = 0.78 + 1.07x_1 + 1.01x_2 + 0.41x_3 + 1.04 x_1x_2 + 0.86x_1x_3 + 0.45x_2x_3 + 0.35x_1^2 + 0.40x_2^2 + 0.52x_3^2$$

em que Y_1 é a resposta de produtividade da levana, X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis pH, temperatura e tempo. Nesta primeira avaliação, a maior produtividade da levana foi 4.8 g.L⁻¹.h⁻¹ (Tabela 1), nas condições de pH 7, 37 °C por 18 horas. Mantendo a temperatura e o tempo, e diminuindo o pH para 5, ocorreu uma redução de 10 vezes na produtividade, atingindo 0.48 g.L⁻¹.h⁻¹, demonstrando que o pH é significativo e determinante para o processo. Da mesma forma, variando a temperatura de 37 °C para 25 °C ocorreu uma queda da produtividade para 0,51 g.L⁻¹.h⁻¹, comprovando o efeito positivo e significativo dessa variável. A grande variação da resposta obtida reflete a importância da otimização das condições de cultivo, buscando o ponto ótimo da resposta desejada (Liu et al., 2010).

Aliado ao alto coeficiente de correlação ($R^2 = 0,97$) e a falta de ajuste não significativa ($p = 0,087$), o modelo pode ser usado para fins preditivos, uma vez que os valores previstos *versus* os valores observados confirmaram que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais.

A produtividade de levana tende a aumentar, quando a temperatura (X_2) e o tempo (X_3) aumentam em pH fixado em 7. Considerando os resultados obtidos com valor de produtividade de levana (4.80 g.L⁻¹.h⁻¹) e objetivando um

aumento da produtividade, um segundo delineamento Box e Behnken (1960) com 15 experimentos e 3 repetições no ponto central foi proposto. Para encontrar o ponto ótimo, as variáveis (X_1) pH, (X_2) temperatura e (X_3) tempo tiveram seus valores aumentados. Para tanto, a melhor condição encontrada no primeiro delineamento foi ajustada como os níveis inferiores para as variáveis X_1 e X_2 e ponto central para a variável X_3 (Tabela 2).

Os resultados obtidos, deste segundo delineamento, por meio da ANOVA ($\alpha = 5\%$) e o teste t demonstraram que as variáveis, temperatura e tempo foram significativas, e a variável (X_1) pH teve significância de 6%, sendo considerada para as análises. A variável (X_3) tempo, apresentou efeito negativo e foi a que mais influenciou no processo ($p = 0.015$). Foi possível observar que, ao manter pH e temperaturas fixos, ocorreu um decréscimo de 35% da produtividade, quando o tempo foi aumentado de 18 para 30 horas, como pode ser observado ao comparar os ensaios (6 e 8) e (10 e 12). Shih e Yu (2005) e Shih et al. (2005) obtiveram os maiores valores no tempo de 21 horas, diminuindo conforme o tempo aumentava. Abdel-Fattah et al. (2005) produziram a maior quantidade de levana no tempo de 18 horas, sendo que em tempos inferiores a produção ainda não tinha atingido o máximo e após as 18 horas os valores passaram a diminuir.

Com relação à temperatura, verificou-se um aumento de até 54% da produtividade da levana, ao aumentá-la de 32 para 42 °C, como pode ser observado nos ensaios (1 e 3) e (2 e 4) justificando seu efeito significativo e positivo. Shih et al. (2005) utilizando *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi, observaram uma faixa ótima para produção de levana que se estende de 25 a 40 °C. Ammar et al. (2002) também utilizando o mesmo microrganismo definiu a melhor temperatura para a produção de levana sendo 40 °C.

A intercepção foi novamente significativa, indicando que a escolha do ponto central (pH 8, 37 °C e 24 horas) foi correta. Ao aplicar a análise de regressão nos dados experimentais, foi possível obter a equação polinomial de segunda ordem para a produtividade de levana, como segue abaixo:

$$Y_1 = 5.57 + 0.47x_2 - 0.58x_3 - 0.48x_2x_3 - 1.42x_1^2 - 0.75x_2^2 - 0.64x_3^2$$

Como foi observado no primeiro delineamento, novamente o coeficiente de correlação ($R^2 = 81\%$) foi aceitável e a falta de ajuste do modelo foi não significativa ($p = 0.052$) atribuindo mais uma vez alta confiabilidade do modelo.

O maior valor encontrado para a produtividade de levana foi $5.57 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, correspondendo ao ponto central do planejamento, quando as variáveis (X_1) pH, (X_2) temperatura e (X_3) tempo apresentavam os valores iguais a 8, 37°C e 24 horas. Pelo modelo desenvolvido o valor máximo de produtividade da levana a ser encontrado seria igual a $5.86 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no ponto (0; 0,5; - 0,5), onde as variáveis são pH 8, temperatura de 39.5°C e tempo de 21 horas. A validação do ponto ótimo foi feita em triplicata e o *test t* foi aplicado. O resultado demonstrou que não houve diferença ($p = 0.54$) entre o ponto ótimo ($5.86 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e as médias da validação ($5.82 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Desta forma a condição encontrada de $5.82 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ é o valor máximo para a produtividade utilizando este modelo, correspondendo a otimização do processo, que pode ser observado pela Figura 1, demonstrando uma curvatura no ponto central das variáveis.

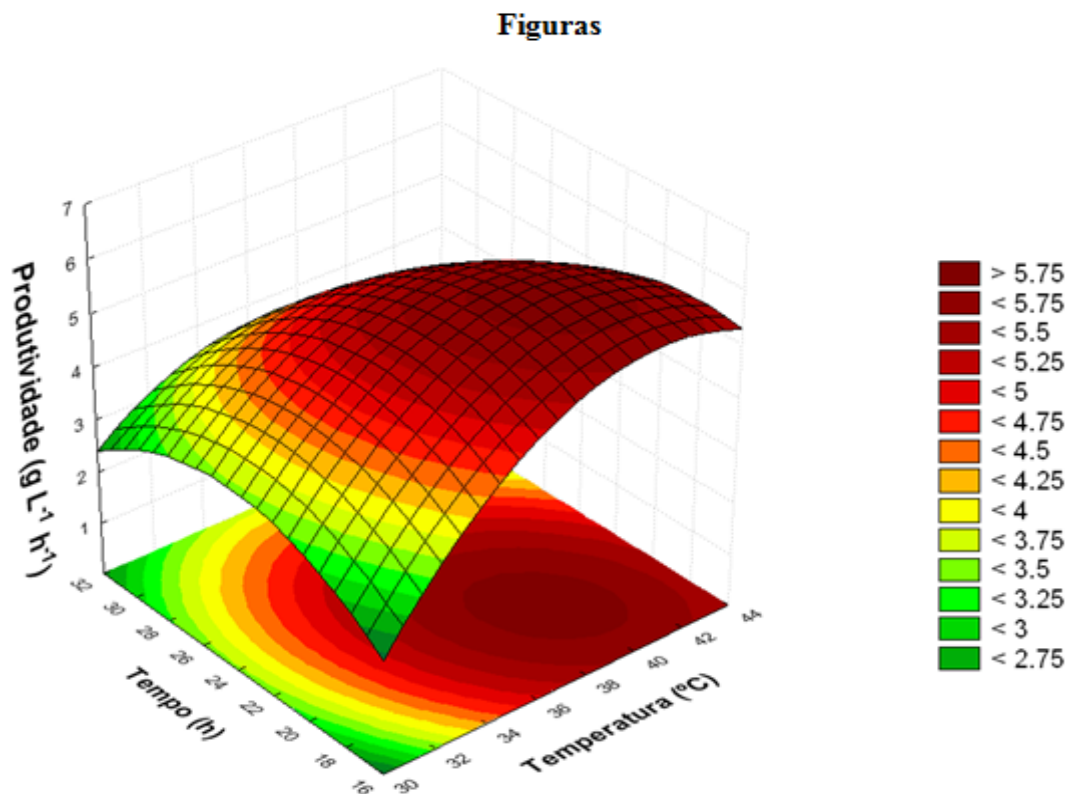


Figura 1 – Superfície de resposta da produtividade de levana para a temperatura (X_2) e tempo (X_3) em pH (X_1) fixado em 8 após a otimização do processo.

O valor encontrado de $5.82 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a produtividade de levana por *Bacillus subtilis* Natto, foi o maior valor descrito em literatura. Melo et al. (2007), Oliveira et al. (2007) e Borsari et al. (2010) utilizaram *Zymomonas mobilis* para produzir levana em meio contendo entre 15 e 25 g.L^{-1} de sacarose como fonte de carbono, pH 6 em uma faixa de 20 a 25°C , e conseguiram obter uma produção de 14,67; 21,68 e $13,37 \text{ g.L}^{-1}$ correspondendo a uma produtividade máxima de levana igual a $2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Liu et al. (2010) utilizaram o *Paenibacillus polymixa* em meio contendo 20 g.L^{-1} de sacarose, 24°C e pH 8 alcançaram uma produção de $36,26 \text{ g.L}^{-1}$, correspondendo a uma produtividade de $0.6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Os maiores valores reportados para a produção de levana foram conseguidos utilizando o *Bacillus subtilis*. Takesue et al. (2009) utilizaram a variedade pHT – D36 e obtiveram uma produção de $79,6 \text{ g.L}^{-1}$, correspondendo a uma produtividade de $2.84 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em meio contendo 25 g.L^{-1} de sacarose, 37°C e pH 8. Shih et al. (2005), Shih e Yu (2005) e Shih et al. (2010), utilizaram a variedade (natto) Takahashi, mesma utilizada neste trabalho, e produziram 50, 50 e $70,6 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, correspondendo a uma produtividade de $2.5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de levana, utilizando 20 g.L^{-1} de sacarose com fonte de carbono, pH 6 em uma faixa de temperatura de 25 a 40°C , o que demonstra o alto potencial de produção do microrganismo utilizado neste trabalho e a eficiência do processo de otimização.

Bergeron et al. (2000) relatam que, em meios com grande concentração de sacarose, o microrganismo passa a produzir a levana em maior quantidade para protegê-lo sob a condição estressante, portanto uma das prováveis causas desta produtividade elevada deve-se ao ótimo desempenho da cepa utilizada aliado a grande quantidade de sacarose usada como fonte de carbono (300 g.L^{-1}), uma vez que, quando em concentrações inferior a 30%, favorecem a atividade de hidrólise enquanto que próximo a 30 g.L^{-1} favorecem a atividade de transferase, formando a levana (Meng e Fürtterer, 2003). A formação da levana esta intimamente ligada com a taxa de hidrólise da sacarose, que por sua vez depende do pH e temperatura (Lyness e Doelle, 1983) variáveis otimizadas no experimento, e da cepa utilizada, que como observado nos trabalhos de Shih et al. (2005) e Shih et al. (2010), utilizando o *B. subtilis* Natto, alcançaram os maiores valores de produtividade já relatados.

3.2 ANÁLISE DA MASSA MOLAR DE LEVANA POR HPSEC-RID-MALLS

A levana correspondente a melhor produtividade ($5,82 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), obtida nas condições de cultivo com pH 8, temperatura de $39,5^\circ\text{C}$ em 21 horas foi submetida a análise de massa molar por HPSEC- RID - MALLS. Os resultados estão representados nos cromatogramas na Figura 2. Por meio desta análise, foi possível obter a massa molecular média de dois picos, bem como a porcentagem de cada um.

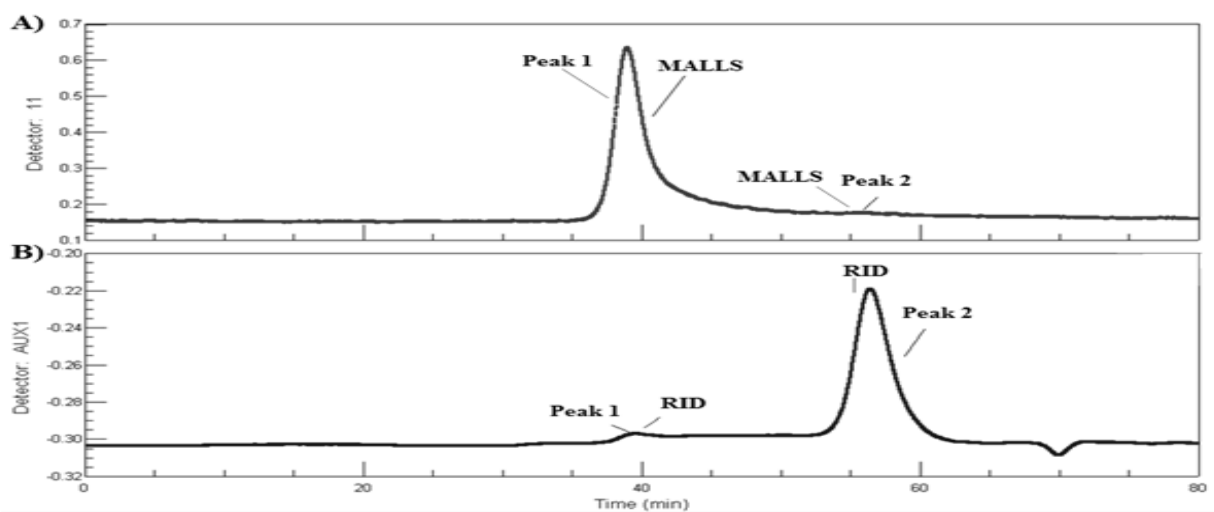


Figura 2 – Cromatogramas da levana de *Bacillus subtilis* Natto obtidos da melhor condição de cultivo (pH 8, $39,5^\circ\text{C}$; 21 horas), analisado por Cromatografia de Exclusão Molecular de Alta Performance (HPSEC). Em A) amostra detectada pelo detector de dispersão de luz multi – angular (MALLS); em B) amostra detectada pelo detector de índice de refração (RID).

O Pico 1 corresponde a uma massa de 4146 kDa, equivalente a 5% do total da amostra. O Pico 2 apresenta maior sinal no RID com baixo espalhamento de luz, o que sugere a presença de um componente majoritário de baixa massa molecular com 72,37 kDa, equivalente a 95% do total da amostra.

Shih et al. (2005) e Shih et al. (2010), utilizando o *B. subtilis* Natto, também produziram dois tipos de levana, uma de alta e outra de baixa massa molecular, fato também observado por Euzenat et al. (1997), que ao realizarem a fermentação da sacarose, utilizando *B. subtilis*, observaram que ao longo do processo ocorria a formação de ambas as massas moleculares, porém, com o decorrer da fermentação, a massa molecular predominante passava a ser a menor. Uma das explicações para a maior produção de levana de baixa massa molecular

obtida, pode ser a utilização do pH inicial no valor de 8, que segundo Shu e Lung (2004), conforme aumenta o pH, favorece a produção do EPS com uma massa menor. Outro fator que também pode ter contribuído foi o meio de cultivo, que era composto por 30 g.L⁻¹ de sacarose, o que favoreceria a produção de uma massa menor, de acordo com o trabalho de Shih et al. (2005), que utilizando o *B. subtilis* Natto e concentrações inferiores de sacarose (20 g.L⁻¹), obtiveram uma concentração maior de levana de alta massa molecular (1794 kDa), porém, com o decorrer da fermentação, a levana de baixa massa molecular (11 kDa), se igualou a de alta e após 21 horas, já predominava no meio, sendo um outro fator importante da distribuição da massa. Ainda utilizando o mesmo microrganismo, Shih et al. (2010) encontraram dois picos, um de alta (2000 kDa) e um de baixa (6,7 – 8,4 kDa), quando variaram a concentração de sacarose entre 0 e 250 g.L⁻¹, sendo que conforme aumentava-se a concentração, o pico da maior massa diminuía, enquanto que o de menor aumentava.

Com relação ao uso do *B. subtilis*, Abdel-Fattah et al. (2005), utilizaram glicose e sacarose como fontes de carbono na síntese da levana e frutoligossacarídeos e observaram que a concentração da sacarose juntamente com a temperatura, foram fatores decisivos na distribuição da massa molecular, uma vez que, ao utilizarem concentrações inferiores a 5 g.L⁻¹, levanas de alta massa molecular eram formadas, enquanto que concentrações superiores a 5 g.L⁻¹ favoreciam a formação de levanas de baixa massa molecular, e em temperaturas entre 15 e 20 °C e acima de 40, devido a degradação, também ocorria a predominância de levanas de baixa massa molecular, fatos também constatados previamente por Euzenat et al. (1997), que produziram levanas de baixa massa molar em temperaturas superiores a 37 °C e em altas concentrações de sacarose (2,6 M).

3.3 ANÁLISE METABOLÔMICA DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA LEVANA POR ¹H-RMN

Os estudos sobre a atividade antitumoral da levana microbiana têm revelado resultados promissores. Calazans et al. (1997) e Calazans et al. (2000) utilizando levanas de *Zymomonas mobilis*, na concentração de 200 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo, em camundongos suíços e ratos com sarcoma 180 e carcinoma Ehrlich induzidos, conseguiram reduzir as massas tumorais entre 22 e 74%. Os autores

atribuíram a variação no percentual de redução da massa tumoral às diferentes levanas de massas molares que variaram entre 350 e 1070 kDa. Porém, em todas as faixas foram observadas reduções da massa tumoral, sendo que a massa correspondente a 457 kDa foi a que mais teve efeito sob o tumor.

Pesquisas *in vitro* utilizando linhagens de carcinoma gástrico (SNU-1) e carcinoma hepatocelular (HepG2) humano foram realizadas para estudar o efeito de diferentes levanas de *Microbacterium laevaniformans* e demonstraram resultados promissores. Yoo et al. (2004) e Yoon et al. (2004) aplicaram nestas culturas cancerosas levanas de massas molares diferentes (40 - 710 kDa) e com graus de ramificação entre 4.3 e 12.3%, na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e observaram que, independente do tipo de levana, ocorria a inibição e redução das células cancerosas, que variaram entre 39 e 68%. Oh et al. (2004) também usando diferentes levanas (10 e 1000 kDa) na concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, nas mesmas linhagens tumorais, conseguiram promover a redução do crescimento celular entre 18 e 84%, observando que a massa igual a 80 kDa foi a que mais promoveu redução da atividade tumoral.

A levana de *B. subtilis* Natto, testado neste trabalho, obtida na melhor condição de cultivo e apresentando as massas molares 72.37 e 1146 kDa, foi aplicada em cultura de células HepG2, em uma concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 48 horas, para estudar em nível metabólico as alterações causadas pela sua atividade antitumoral. Para tanto, a análise do metabóloma das células da linhagem HepG2 com e sem levana, foi realizada por ^1H - NMR.

Os resultados referentes aos tratamentos com e sem levana da célula HepG2, estão dispostos na Figura 3 e demonstram que 4 metabólitos tiveram sua concentração aumentada no tratamento com levana, sendo eles: acetato (singleto em 1,92 ppm), alanina (quarteto em 3,76 ppm e duplete em 1,46), fosfocreatina (singleto em 3,03 e 3,92 ppm) e lactato (quarteto em 4,09 ppm e duplete em 1,31 ppm).

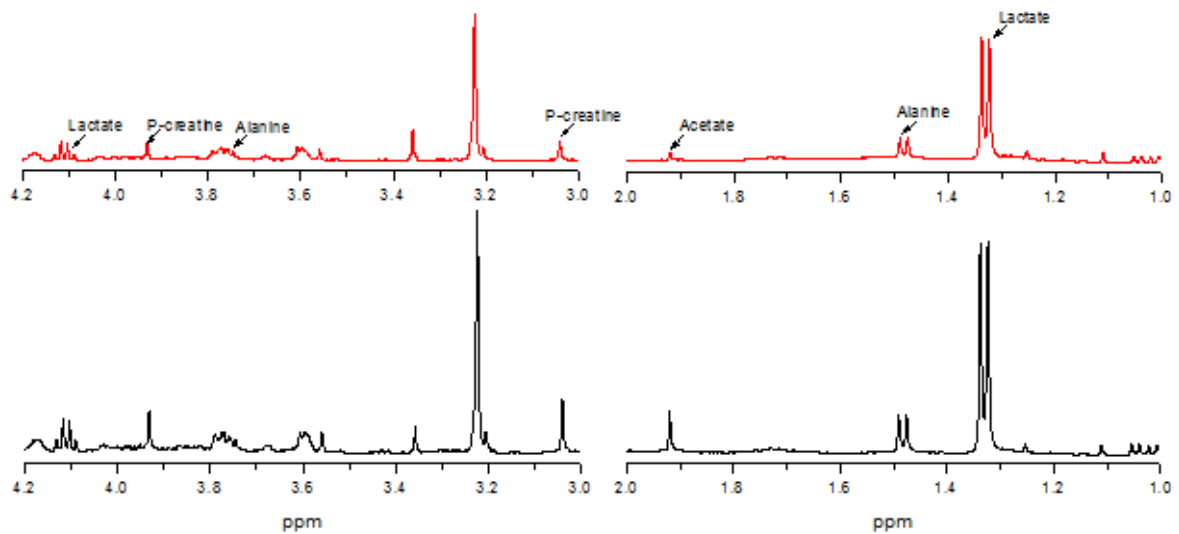


Figura 3 – Espectro referente às dispersões químicas compreendidas entre (1 e 2 ppm) e (3 e 4.2 ppm) onde foi encontrado variação na concentração dos metabólitos produzidos pelas células HepG2 na ausência (vermelho) e presença (preto) de levana após análise por $^1\text{H-NMR}$ em 500 MHz, pH 7 e 25 °C. As setas apontam para os picos correspondentes a dispersão química dos metabólitos acetato, alanina, fosfocreatina e lactato.

Os resultados (Figura 3) sugerem que a atividade antitumoral da levana pode estar associada a um aumento da quantidade de lactato intracelular, uma vez que seu acúmulo pode reduzir o pH intracelular inativando enzimas e proteínas essenciais para o funcionamento celular (Maxwell et al., 1988).

O lactato normalmente é produzido em condições de hipóxia, onde o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) é inibido pela falta de oxigênio, tendo como consequência o aumento da glicólise anaeróbica (Vaupel, 2010). A levana, mesmo sendo um polímero, não poderia por si só inibir as trocas gasosas de forma direta, mas sendo um polissacarídeo pode fornecer sinais celulares, principalmente por termos observado aumento nos níveis de fosfocreatina, oposto ao que se esperaria na hipóxia onde os níveis de fosfocreatina seriam reduzidos, uma vez que a fosfocreatina é considerada um reserva intracelular primária de energia, em vários tecidos como o coração (ten Hove e Neubauer, 2006).

Scharte et al. (2006) observaram que células hepáticas de ratos reconhecem a porção polissacarídica do antígeno lipopolissacarídeo (LPS) desencadeando uma resposta onde, durante a transdução do sinal, ocorre estímulo de produção de fator de indução de hipóxia (HIF-1). O HIF-1 influencia nos níveis de H^+ intracelular, suprimindo o TCA e a fosforilação oxidativa induzindo a piruvato

desidrogenase quinase (PDK), o que acarreta na inibição da piruvato desidrogenase bloqueando a conversão de piruvato em Acetil-CoA, resultando no aumento do lactato, da l-alanina e do acetato em nosso trabalho. O HIF-1 aumenta a expressão de proteínas de captação de glicose (e.g. transportadores de glicose 1 [GLUT1]) e conversão de glicose em piruvato (Simon, 2006).

O HIF-1 também aumenta a expressão de vários genes, incluindo: a) o gene que codifica a enzima óxido nítrico sintase (NOS) responsável pela formação do óxido nítrico, um radical livre que pode contribuir para morte celular; b) o gene do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que favorece a vascularização tecidual; c) o gene da cicloxigenase-2 (COX-2) que desencadeia do processo inflamatório; d) os genes das anidrases IX e XII que geram bicarbonato a partir do CO₂ na tentativa de equilibrar o pH celular; e) o gene do transportador monocarboxilato (MTC4) que exporta lactato para o meio extracelular (Hellwig-Bürgel et al., 2005).

Huang e col. (2004) demonstraram que deleções no gene HIF-1 em cardiomiócitos promovem uma redução nos níveis de ATP, fosfocreatina e lactato colaborando com a idéia que o estímulo do HIF-1 pode estar envolvido na resposta biológica promovida pela levana neste trabalho.

Os resultados da análise metabolômica revelaram um possível mecanismo antitumoral da levana e é importante apontar também que o aumento da concentração do lactato está associado com aumento da expressão de genes de metástase (Brizel et al., 2001) e que a própria ativação do HIF-1 acaba desencadeando também respostas de adaptação celular, desta forma o uso da levana como antitumoral deve ser considerado com cautela. Portanto, mais estudos devem ser realizados visando identificar mecanismos da atividade antitumoral da levana.

Conclusão

A produtividade da levana de *B. subtilis* Natto foi otimizada alcançando $5,82 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, sendo um dos maiores valores encontrados na literatura, indicando o alto potencial de produção da cepa. A levana otimizada apresentou duas massas moleculares iguais a 4186 kDa (5%) e 72,37 kDa (95%), favorecendo uma faixa maior de aplicações. A análise metabolômica revelou alterações no perfil metabólico das células tratadas com levana, o que provocou alterações nas vias de obtenção de energia e na homeostase celular, justificando sua ação antitumoral através de acúmulo intracelular de lactato.

Agradecimentos

Os autores agradecem pelo suporte financeiro fornecido pela CAPES – Brasil e pelo apoio do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) na hospedagem e uso de sua infraestrutura na realização deste trabalho.

Referências

- Abdel-Fattah, A. F., Mahmoud, D. A. R., Esawy, M. A. T., 2005. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and Enzymic Synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology* 51, 402 – 407.
- Ammar, Y. B., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Minamiura, N., 2002. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of Biotechnology* 99, 111 – 119.
- Ananthalakshmy, V. K., Gunasekaran, P., 1999. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 42, 291 – 297.
- Barros, B., Scarmino, S. I., Bruns, E. R., 1995. Planejamento e otimização de experimentos. Editora Unicamp, Campinas.
- Bergeron, L. J., Morou-Bermudez, E., Burne, R. A., 2000. Characterization of the Fructosyltransferase Gene of *Atinomyces naeslundii* WVU45. *Journal of Bacteriology* 182, 3649 – 3654.
- Borsari, R. R. J., Buzato, J. B., Silva, R. S. S. F., Celligoi, M. A. P. C., 2010. Evaluation of supplementation of sucrose medium on the synthesis of *Zymomonas mobilis* bio-products. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 32, 229-233.
- Box, G. E. P., Behnken, D. W., 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2, 455 – 475.
- Brizel, D. M., Schroeder, T., Scher, R. I., Walenta, S., Clough, R. W., Dewhirst, M. W., Mueller-Klieser, W., 2001. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head- and- neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 51, 349 – 353.
- Cao, Y., Ikeda, I., 2009. Antioxidant activity and antitumor activity (*in vitro*) of xyloglucan selenious ester and surfated xyloglucan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 231 – 235.
- Calazans, G. M. T., Lopes, C. E., Lima, R. M. O. C., França, F. P., 1997. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters* 19, 19 – 21.
- Calazans, G. M. T., Lima, R. C., França, F. P., Lopes, C. E. 2000. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules* 27, 245 – 247.
- Chen, W., Zhao, Z., Chen, S. F., Li, Y. Q., 2008. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro*. *Bioresource Technology*, 99, 3187 – 3194.
- El-Refai, H. A., Abdel-Fattah, A. F., Mostafa, F. A., 2009. Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of

levansucrase stability by carbohydrate coupling. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 25, 821 – 827.

Euzenat, O., Guibert, A., Combes, D., 1997. Production of fructo oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry* 32, 237 – 243.

Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., Kell, D. B., 2004. Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology* 22, 245 – 252.

Griffiths, J. R., 2003. Opportunities for studying cancer by metabolomics: preliminary observations on tumors deficient in hypoxia-inducible factor 1. *Advances in Enzyme Regulation* 43, 67 – 76.

Han, Y. W., Clarke, M. A., 1990. Production and characterization of microbial levan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 393 – 396.

Harrigan, G.G., Brackett, D.J., Boros, L.G., 2005. Medicinal Chemistry, Metabolic Profiling and Drug Target Discovery: A Role for Metabolic Profiling in Reverse Pharmacology and Chemical Genetics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 5, 13 – 20.

Hellwig-Bürgel, T., Stiehl, D. P., Wagner, A. E., Metzen, E., Jelkmann, W., 2005. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 25, 297 – 310.

Huang, Y., Hickey, R. P., Yeh, J. L., Liu, D., Dadak, A., Young, L. H., Johnson, R. S., Giordano, F. J., 2004. Cardiac myocyte-specific HIF-1 α deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *The FASEB Journal* 18, 1138 – 1140.

Keun, H. C., 2006. Metabonomic modeling of drug toxicity. *Pharmacology & Therapeutics* 109, 92 – 106.

Kusmann, M.; Raymond, F.; Affolter, M., 2006. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *Journal of Biotechnology* 124, 758 – 787.

Le Belle, J.E., Harris, N.G., Williams, S.R., Bhakoo, K.K., 2002. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ^1H NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine* 15, 37 – 44.

Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., Zeng, X. 2010. Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers* 79, 206 – 213.

Lundberg, P., Vogel, T., Malusek, A., Lundquist, P-O., Cohen, L., Dahlqvist, O., 2005. MDL - The Magnetic Resonance Metabolomics Database (mdl.imv.liu.se), ESMRMB, Basel, Switzerland.

Lyness, E. W., Doelle, H. W., 1983. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters* 5, 345 – 350.

- Maxwell, R. J.; Pryor-Jones, R. A.; Jenkins, J. S.; Griffiths, J. R., 1988. Vasoactive intestinal peptide stimulates glycolysis in pituitary tumours; $^1\text{H-NMR}$ detection of lactate in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* 968, 86 – 90.
- Melo, I. R., Pimentel, M. F., Lopes, C. E., Calazans, G. M. T., 2007. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 38, 45 – 51.
- Meng, G., Fütterer, K., 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology* 10, 935 – 941.
- Nelson, N. A. A., 1944. Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *The Journal of Biological Biochemistry* 153, 375 – 380.
- Oh, I.K., Yoo, S. H., Bae, I. Y., Cha, J., Lee, H. G., 2004. Effects of *Microbacterium laevaniformans* Levans Molecular Weight on Cytotoxicity. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 985 – 990.
- Oliveira, M. R., Silva, R. S. S. F., Buzato, J. B., Celligoi, M. A. P. C., 2007. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal* 37, 177–183.
- Rui, L., Wei-Chang, C., Wei-Peng, W., Wen-Yan, T. Xue-Guang, Z., 2010. Antioxidant activity of *Astragalus* polysaccharides and antitumor activity of the polysaccharides and siRNA. *Carbohydrate Polymers*, 82, 240 – 244.
- Scharte, M., Han, X., Uchiyama, T., Tawadrous, Z., Delude, R. L., Fink, M. P., 2006. LPS Increases Hepatic HIF-1 α Protein and Expression of the HIF-1-Dependent Gene Aldolase A in Rats. *Journal of Surgical Research* 135, 262 – 267.
- Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J., Hsieh, C. Y., 2005. Selective Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 8211 – 8215.
- Shih, I. L., Yu, Y. T., 2005. Simultaneous and selective production of levan and poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters* 27, 103 – 106.
- Shih, I. L., Chen, L. D., Wu, J. Y., 2010. Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. *Carbohydrate Polymers* 82, 111 – 117.
- Shu, C. H., Lung, M. Y., 2004. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharides by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochemistry* 39, 931 – 937.
- Simon, M. C., 2006. Coming up for air: HIF and mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism* 3, 150 – 151.
- Somogyi, M. A., 1952. A new reagent for determination of sugar. *Journal Biology Chemistry* 160, 61 – 68.

Srivastava, S., Govil, G., 2001. Application of NMR to the Study of Cells and Body Fluids. *Current Organic Chemistry* 5, 1039 – 1057.

Takesue, N., Sone, T., Tanaka, M., Tomita, F., Asano, K., 2009. Effect of an additionally introduced degQ gene on di-D-fructofuranosyl 2,6:2,6 anhydride (DFA IV) production by recombinant *Bacillus subtilis* in a single culture production system. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107, 623 – 629.

Takeuchi, A., Kamiryu, Y., Yamada, H., Eto, M., Shibata, K., Haruna, K., Naito, S., Yoshikai, Y., 2009. Oral administration of xanthan gum enhances antitumor activity through Toll-like receptor 4. *International Immunopharmacology* 9, 1562 – 1567.

ten Hove, M., Neubauer, S., 2006. Evaluating metabolic changes in heart disease by magnetic resonance spectroscopy. *Heart and Metabolism* 32, 18–21.

Tong, H., Xia, F., Feng, K., Sun, G., Gao, X., Sun, L., Jiang, R., Tian, D., Sun, X., 2009. Structural characterization and *in vitro* antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology* 100, 1682 – 1686.

Vaupel, P., 2010. Metabolic microenvironment of tumor cells: a key factor in malignant progression. *Experimental Oncology* 32, 125–127.

Vizán, P., Mazurek, S., Cascante, M., 2008. Robust metabolic adaptation underlying tumor progression. *Metabolomics* 4, 1 – 12.

Yoo, S. H., Yoon, E. J., Cha, J., Lee, H. G., 2004. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules* 34, 37 – 41.

Yoon, E. J., Yoo, S. H., Cha, J., Lee, H. G., 2004. Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 34, 191 – 194.

Zhao, L., Chen, Y., Ren, S., Han, Y., Cheng, H., 2010. Studies on the chemical structure and antitumor activity of an exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613. *Carbohydrate Research* 345, 637 – 643.

ANEXO B

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA LEVANA DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO
COMO POSSÍVEL AGENTE HIPOGLICEMIANTE EM RATOS DIABETOGÊNICOS
INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA**

**INVESTIGATION OF LEVAN EFFECTS FROM *BACILLUS SUBTILIS* NATTO AS A
POTENTIAL HYPOGLYCEMIC AGENT IN DIABETIC RATS INDUCED BY
STREPTOZOTOCIN**

**Fernando Cesar Bazani Cabral de Melo; Cássia Thaïs B. V. Zaia; Maria Antonia
Pedrine Colabone Celligoi**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA LEVANA DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO
COMO POSSÍVEL AGENTE HIPOGLICEMIANTE EM RATOS DIABETOGÊNICOS
INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA**

**INVESTIGATION OF LEVAN EFFECTS FROM *BACILLUS SUBTILIS* NATTO AS A
POTENTIAL HYPOGLYCEMIC AGENT IN DIABETIC RATS INDUCED BY
STREPTOZOTOCIN**

**Fernando Cesar Bazani Cabral de Melo¹; Cássia Thaís B. V. Zaia²; Maria
Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{1*}**

Resumo

A levana é um exopolissacarídeo de frutose formada por ligações do tipo β -(2→6) e pontos de ramificação do tipo β -(2→1). Devido suas propriedades químicas e físicas a levana pode ser aplicada tanto em indústria de alimentos como farmacêutica. O *Bacillus subtilis* é um potencial produtor de levana uma vez que fermenta sacarose e tem capacidade de formar levana. Recentemente uma nova variedade de *B. subtilis* foi isolada do alimento Japonês natto e tem produzido grandes quantidades de levana. Considerando suas aplicações farmacêuticas, este trabalho objetivou investigar o efeito hipoglicêmico da levana de *Bacillus subtilis* Natto, previamente otimizada com massa molar igual a 72,37 e 4146 kDa, em ratos machos da linhagem Wistar diabetogênicos induzidos por estreptozotocina e não diabetogênicos, bem como acompanhar os valores de colesterol e triacilglicerol. Após 16 dias de experimentos os animais foram sacrificados, o sangue coletado e os parâmetros estudados foram analisados e comparados através de análise de variância. Os resultados demonstraram que para este tipo de levana, não ocorreu o efeito hipoglicêmico, uma vez que não houve melhora do quadro de diabetes durante o experimento. Entretanto, a levana também não alterou nenhum dos parâmetros estudados nos ratos normais, podendo ser utilizada para outros fins.

Palavras - chave: Levana. *Bacillus subtilis* Natto. Hipoglicêmico.

¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, SC 86051-990 Londrina, Brasil. *Autor correspondente Tel.: +55 43 33714270. Endereço de E-mail: macelligoi@uel.br

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, SC 86051-990 Londrina, Brasil

Abstract

Levan is an exopolysaccharide of fructose formed by the linkage of β -(2 \rightarrow 6) and ramifications β -(2 \rightarrow 1). Due to its chemical properties levan presents applications in both food and pharmaceutical industries. *Bacillus subtilis* is a promising industrial levan producer as ferments sucrose and high levan formation capacity. A new strain of *B. subtilis* was recently isolated from Japanese food natto and it has produced levan in large quantities. Regarding its pharmaceutical applications, this study aimed to investigate the hypoglycemic effect of levan by *Bacillus subtilis* Natto, previously optimized with molecular weight equal to 72.37 e 4146 kDa, in diabetogenic Wistar male rats induced by streptozotocin and non-diabetic rats, as well as monitor their cholesterol and triacylglycerol values. After 16 days of experiments, the animals were sacrificed and the blood samples were analyzed and the results were compared using analysis of variance. The results demonstrated that for this type of levan, the hypoglycemic effect was not observed, since there was no improvement of diabetes symptoms during the experiment. However levan did not affect any studied parameters in normal rats, indicating that the exopolysaccharide may be used for other purposes.

Key words: Levan. *Bacillus subtilis* Natto. Hypoglycemic.

Introdução

O *diabetes mellitus* é uma doença crônica cujo índices de incidência crescem cada vez mais, provocando um elevado número de óbitos. Além de proporcionar o aumento de glicose plasmática (ZOU et al. 2010), o diabetes também eleva o nível de colesterol (YAO; HUANG; CHIANG, 2008), facilitando o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (TZANG et al. 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em todo o mundo, o número de pessoas com diabetes no ano de 2000 era de 171 milhões e a previsão para o ano de 2030 é de 366 milhões (World Health Organization, 2009).

Muitos dos medicamentos comercializados atualmente apresentam diversos efeitos colaterais e limitações (KUZUYA et al., 2002), tornando necessário o estudo de alternativas a estes medicamentos. Recentemente, muitos polissacarídeos naturais e não tóxicos isolados de bactérias, fungos e plantas, com potencial aplicação contra o diabetes vêm sendo estudados, dentre eles a levana (YAMAMOTO et al., 1999; KANG et al., 2006; CHEN et al., 2009), oligossacarídeo ROS (ZHANG et al., 2004), heteropolissacarídeo proteico (HWANG et al., 2005), heteropolissacarídeo CSP-1 (LI et al., 2006), botriosferana (MIRANDA, 2006) heteropolissacarídeo PPSB (TONG; LIANG; WANG, 2008), quitosana (LIU; ZHANG;

XIA, 2008; YAO; HUANG; CHIANG, 2008) e polissacarídeo ácido LBP-1 (ZOU *et al.*, 2010).

A levana é um polissacarídeo de frutose formada por uma cadeia principal com ligações do tipo β (2 \rightarrow 6) e alguns pontos de ramificação do tipo β (2 \rightarrow 1) (HAN; CLARKE, 1990). Apresenta uma série de benefícios que podem ser explorados, principalmente na indústria farmacêutica, destacando seu uso como agente hipoglicemiante, hipocolesterolêmico, anticarcinogênico, substituto do plasma sanguíneo, imunomodulador, imunoestimulador, prolongador do efeito de certas drogas e agente anti-citotóxico (DOELLE *et al.*, 1993; CALAZANS *et al.*, 2000; BEKERS *et al.*, 2001; SHU; LUNG, 2004, YOO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007; GUPTA *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009).

Muitos microrganismos são capazes de sintetizar a levana, uma vez que possuem a enzima levanasacarase (EC 2.4.1.10), responsável pela formação de levana em meio contendo elevada concentração de sacarose (MENG; FÜTTERER, 2003). Dentre estes se destaca o *Bacillus subtilis* que é um microrganismo não patogênico contra o ser humano (RYAN; RAY, 2004) e com alto potencial de fermentação em meios contendo grandes quantidades de sacarose (EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997; ABDEL-FATTAH; MAHMOUND; ESAWY, 2005). Recentemente uma nova variedade de *B. subtilis* foi encontrada. Isolada do alimento Japonês natto, esta variedade tem produzido grandes quantidades de levana (SHIH *et al.*, 2005), sendo a cepa com maior eficiência de conversão de sacarose em levana reportada até então (SHIH; CHEN; WU, 2010) apresentando grande potencial para produção em escalas maiores.

Para a obtenção de levana é necessário considerar os fatores que influenciam diretamente na sua produção. Além da concentração de carbono do meio (MELO *et al.*, 2007; SHIH; CHEN; YU, 2010), a variação da temperatura, (DOELLE *et al.*, 1993; EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997; ABDEL-FATTAH; MAHMOUND; ESAWY, 2005) o tempo de cultivo (OLIVEIRA *et al.*, 2007; EL-REFAI; ABDEL-FATTAH; MOSTAFA, 2009) e o pH (SHIH *et al.*, 2005; SHIH; CHEN; YU, 2010) são variáveis que podem interferir neste processo.

Considerando que a levana é um polímero de fácil obtenção, não tóxica e com potencial farmacêutico, este trabalho objetivou investigar a atividade hipoglicêmica da levana de *Bacillus subtilis* Natto em ratos diabetogênicos induzidos por estreptozotocina.

Materiais e métodos

Microrganismos e meios de cultivo

O microrganismo utilizado foi o *Bacillus subtilis* Natto, isolado do alimento japonês natto obtido do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia e identificado pela Fundação André Tosello. Preservado no meio contendo em (g.L⁻¹): peptona 50, extrato de carne 30 e ágar 20 e mantida em câmara fria (4°C), sendo renovada a cada 45 dias. O meio de pré – inóculo foi constituído em (g.L⁻¹): sacarose 100; extrato de levedura 2; KH₂PO₄ 2 ; (NH₄)₂SO₄ 1; MgSO₄.7H₂O 0,5 em 1 L de água destilada (CALAZANS et al., 2000). O meio para as fermentações em (g.L⁻¹): sacarose 300, extrato de levedura 2, KH₂PO₄ 1, (NH₄)₂SO₄ 3, MgSO₄.7H₂O 0,6, MnSO₄ 0,2 e Citrato de Amônio 0,25 em 1 L de água destilada (EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997, modificado).

Levana

A produção de levana foi otimizada previamente por metodologia estatística e a melhor condição encontrada foi em pH 8, 39,5 °C em 21 horas, com 300 g.L⁻¹ de sacarose e 100 rpm de velocidade de agitação, utilizando o meio de fermentação descrito no item 2. O valor encontrado foi equivalente a 5,82 g.L⁻¹h⁻¹, o maior valor reportado até agora. A massa molar da levana obtida nestas condições foi determinada por cromatografia de exclusão molecular de alta performance (HPSEC) e dois componentes foram encontrados, um majoritário (95%) de baixa massa molar (72,37 kDa) e outro de alta massa molar (4146 kDa). Esta condição foi simulada em fermentação em escala maior utilizando Erlenmeyer de 2000 mL com 500 mL de volume de trabalho. A levana foi precipitada e dialisada contra água corrente e deionizada e posteriormente aplicada.

Aplicação da levana de *Bacillus subtilis* Natto como agente hipoglicêmico

Solução de levana

A levana da condição otimizada foi utilizada para verificar os efeitos causados em ratos com diabetes induzida. Foi preparada uma solução de levana na concentração de 200 mg.Kg^{-1} de peso corpóreo dos animais segundo Yoo et al. (2004) em água destilada, até solubilização completa. Esta foi submetida a vapor fluente por 20 minutos e, após resfriamento, acondicionada asépticamente para o desenvolvimento dos ensaios biológicos.

Animais e dieta

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais em Experimentação da UEL (CEEA - UEL) sob nº 07/10, processo nº. 1171/2010-08.

Foram utilizados 20 ratos machos com 10 semanas de idade e com peso médio de 200 g da linhagem Wistar. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina – Paraná – Brasil, e mantidos em 4 gaiolas coletivas, onde receberam água e ração (Nivulab) *ad libitum*, em ambiente aclimatizado ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de umidade) com ciclos 12 e 12 horas de claro e escuro (6 a.m. – 6 p.m.). Após uma semana, os animais foram transferidos para gaiolas individuais e divididos em 4 grupos com 5 ratos em cada um: normal (N), normal com levana (N+Lev), diabético (D) e diabético com levana (D+Lev). Os animais pertencentes aos grupos (D) e (D+Lev) receberam injeção intramuscular de estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Co.) dissolvida em solução tampão de citrato (pH 4,5 e 0,01 M) na dose de 65 mg.Kg^{-1} de peso corpóreo, para indução do diabetes (BOLKENT et al., 2000), enquanto que os animais dos grupos (N) e (N+Lev) receberam apenas o tampão citrato. Dois dias após a injeção do agente diabetogênico (STZ) a glicose foi determinada na urina, por glicofitas, sendo que os animais que apresentaram uma taxa acima de 250 mg.dL^{-1} , foram considerados animais diabéticos. Os grupos (N+Lev) e (D+Lev), receberam 0,3 mL da solução de levana (200 mg.Kg^{-1} de peso corpóreo), uma vez ao dia, via gavagem, durante 15 dias de tratamento, enquanto que os grupos (N) e (D) receberam água destilada, respeitando o mesmo intervalo. O ganho de peso, o consumo médio de ração, medido em gramas de alimento consumido para cada 100 g de peso corpóreo

(g.100g⁻¹ p.c.) e a taxa de eficiência de conversão de alimentos foram analisados ao longo dos 15 dias de experimento.

Determinação da glicose, colesterol total e triacilglicerol

Após o último dia de tratamento, os animais foram colocados em jejum por 16 horas e submetidos à eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado em tubos heparinizados (Liquemine 5000 UI) e centrifugado a 7000 g por 30 minutos para a separação do plasma. Imediatamente após a separação, foram realizadas as dosagens de glicose plasmática pelo método de oxidase/peroxidase; colesterol total plasmático pelo método de esterase/peroxidase/oxidase e triglicérides pelo método de lipase/gliceroquinase/glicerol-Poxidase, todos utilizando os kits bioquímicos (Biodiagnóstica), para testar a atividade hipoglicemiante da levana. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$) e teste t.

Resultados e discussão

Análise do efeito da levana de *B. subtilis* Natto em animais com diabetes mellitus

O quadro de *diabetes mellitus* provoca uma desordem em nível metabólico impedindo a absorção da glicose pelas células, aumentando o nível desta na corrente sanguínea e causando inúmeras consequências para o organismo (ZOU et al., 2010). Nos ratos utilizados nos experimentos o *diabetes* foi induzido pela ação da estreptozotocina (STZ), um antibiótico de amplo espectro originado de *Streptomyces acromogenes*, que destrói as células β pancreáticas impedindo a produção de insulina, caracterizando o *diabetes mellitus* tipo I (HWANG et al., 2005), impossibilitando a recuperação dos animais, podendo ser observados apenas melhoras dos sintomas ao longo do tratamento com compostos que promovam a redução do *diabetes*. Desta maneira, a levana obtida da melhor condição de produtividade, foi administrada nos ratos machos da linhagem Wistar ao longo do experimento em uma concentração igual a 200 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo dos animais (YOO et al, 2004).

Após quinze dias de experimento as concentrações de glicose, colesterol total e triacilglicerol plasmáticas foram medidas, e os resultados estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1 – Concentração plasmática de glicose, colesterol total e triacilglicerol em ratos normais (N), normais com levana (N+Lev), diabéticos (D) e diabéticos com levana (D+Lev), após 15 dias de tratamento.

Grupos	Glicose (mg.dL ⁻¹)	Colesterol Total (mg.dL ⁻¹)	Triacilglicerol (mg.dL ⁻¹)
N	111,64 ± 10,21 ^a	86,83 ± 18,87 ^a	100,03 ± 29,21 ^a
N + Lev	116,11 ± 1,21 ^a	84,59 ± 11,57 ^a	84,61 ± 25,63 ^a
D	434,75 ± 42,08 ^{b*}	86,79 ± 16,69 ^a	564,87 ± 480,14 ^{ab}
D + Lev	437,88 ± 74,14 ^{b*}	115,45 ± 23,60 ^a	1.085,91 ± 407,14 ^b

dose de levana = 200 mg/kg. Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 5). Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

* (p<0,05) em relação aos grupos (N) e (N+Lev)

Os valores médios de glicose plasmática dos ratos normais (N) e normais com levana (N+Lev), não diferiram entre si, da mesma forma entre os dois grupos diabéticos, podendo afirmar, dessa forma, que a levana de *B. subtilis* Natto utilizada não apresentou efeito hipoglicêmico, uma vez que não diminuiu a glicemia no grupo diabético com levana em comparação com o grupo diabético sem levana. Os valores de colesterol total não diferiram entre os grupos de animais normais e diabéticos com ou sem tratamento com levana, e quanto aos valores médios de triacilglicerol, não se observaram diferenças entre os ratos normais e nem entre os animais diabéticos, sugerindo que a levana aplicada não possui efeitos hipocolesterolêmico e hipolipidêmico. Desta forma, os dados obtidos neste trabalho não se aproximam dos dados obtidos nos trabalhos de Yamamoto e colaboradores (1999), que apesar de administrarem dietas hipercalóricas, observaram uma redução no valor de colesterol e glicose plasmáticos de 40% e 10%, respectivamente, quando utilizaram 1 e 5% de levana de alta massa molar (2000 kDa) em ratos. Já Kang e colaboradores (2006) utilizando levanas também de alta massa molecular na concentração de 1, 5 e 10% em ratos obesos, verificaram que ela agia como agente hipolipidêmico, uma vez que inibia a lipogênese e estimulava a lipólise. Também utilizando uma beta frutana, similar a levana, porém com baixa massa molecular (3,2 e 4,29 kDa), Chen e colaboradores (2009) obtiveram uma redução de glicose

plasmática em até 70% em camundongos, mesma redução promovida pelo medicamento Rosiglitazone (droga anti-diabética) usado por estes pesquisadores no experimento.

Outros trabalhos utilizando polímeros de carboidratos originados de plantas (ZHANG et al., 2004; TONG; LIANG; WANG, 2008; ZOU et al., 2010), fungos (HWANG et al., 2005; LI et al., 2006; MIRANDA, 2006), bactérias (EL-GAWAD et al., 2005) e crustáceos (LIU, ZHANG e XIA, 2008; YAO; HUANG; CHIANG, 2008), como agente hipoglicemiante e hipocolesterolêmico, obtiveram uma série de resultados positivos, promovendo reduções na concentração de glicose plasmática, que variaram entre 20 e 70%, e reduções nos de colesterol total plasmático entre 20 e 80%, em ratos e camundongos com *diabetes* induzida por aloxana, estreptozotocina e com dietas hipercalóricas.

Tabela 2 – Ganho médio de peso corpóreo (g.dia⁻¹), consumo médio de ração (gramas por 100 g de peso corpóreo, por dia) e eficiência de conservação de alimento de ratos normais (N), normais com levana (N+Lev), diabéticos (D) e diabéticos com levana (D+Lev), após a indução do diabetes e ao longo dos 15 dias de experimento.

Grupos	Ganho médio de peso corpóreo	Consumo médio de ração	Eficiência de Conversão de alimento
N	5,28±6,08 ^a	10,21±1,18 ^a	0,52
N + Lev	5,08±6,30 ^a	10,60±1,24 ^a	0,48
D	0,91±9,90 ^{b*}	18,27±2,32 ^{b*}	0,05
D + Lev	-0,40±8,67 ^{b*}	20,09±2,20 ^{c,**}	-0,02

dose de levana = 200 mg/kg. Valores expressos em média±desvio padrão (n = 5). Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

* (p<0,05) em relação aos grupos (N) e (N+Lev), ** (p<0,05) em relação aos grupos (D) e (D+Lev).

Aliado aos parâmetros metabólicos alterados, o maior consumo de ração e a diminuição na eficiência de conversão de alimentos, são fatores que caracterizam o quadro clínico da *diabetes mellitus* tipo I, pois uma vez que as células β do pâncreas já não conseguem produzir insulina para captação da glicose plasmática e posterior metabolização, os animais começam a perder peso (LUO et al., 2004).

A análise do ganho de peso, da ingestão de ração e a eficiência de conversão de alimento foram realizadas e os resultados estão dispostos na tabela 2.

Da mesma forma que os parâmetros metabólicos, não houve diferença estatística significativa entre os grupos (N) e (N+Lev), e os grupos (D) e (D+Lev), para o ganho de peso, caracterizando o quadro de diabetes, já que estes últimos perderam peso em relação aos primeiros. Considerando o consumo médio de ração, novamente, não houve diferença entre os grupos (N) e (N+Lev), porém desta vez, os grupos (D) e (D+Lev) foram diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) não apenas dos grupos normais, mas também entre si, uma vez que por portar o diabetes, fator estressante, o comportamento de roer a ração foi muito maior nestes grupos. Nesse sentido, observou-se, ainda, que o segundo grupo (D+Lev) teve um consumo maior ainda do que o grupo (D). Por fim, a eficiência de conversão de alimento foi considerada normal para os grupos (N) e (N+Lev), enquanto para os grupos diabéticos, a taxa foi extremamente baixa, chegando ser negativa para o grupo (D+EPS).

Vale ressaltar, reportando dados de Yao *et al.* (2008), que mesmo tendo efeito hipoglicêmico, a quitosana, não propiciou ganho de peso ao final do experimento. Porém, utilizando polissacarídeos fúngicos (HWANG *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*; 2006), além de reduzir os níveis glicêmicos, também observaram ganho de peso, bem como a eficiência de conversão de alimento aumentou em 66 e 100%, respectivamente, quando comparados aos de animais sem tratamento, enquanto o consumo de ração se aproximou aos dos animais normais.

Dentre os fatores que podem ter contribuído para que a levana de *Bacillus subtilis* Natto não apresentasse atividade hipoglicêmica, hipocolesterolêmica ou hipolipidêmica, a massa molecular pode estar relacionada, uma vez que, em sua maioria, a massa obtida foi de 72 kDa, sendo que de acordo com a literatura citada, resultados positivos foram alcançados com massas consideravelmente maiores ou inferiores. Pode-se inferir também, que o grau de ramificação da molécula pode ter interferido nos resultados, já que o microrganismo utilizado foi diferente, bem como as condições de produção da levana, em relação aos trabalhos revisados. Com relação à dosagem utilizada (200 mg.kg^{-1} de peso corpóreo), ela está de acordo com os autores consultados, e ainda, concentrações superiores a esta, aumentam a viscosidade do meio, dificultando a aplicação da levana nos animais.

Desta forma, mesmo não exercendo os efeitos propostos, a levana não interferiu no metabolismo energético dos animais, uma vez que não foram encontradas alterações significativas entre os grupos normais e entre os diabéticos, demonstrando que, a levana não interfere na homeostase do organismo de uma

maneira geral, podendo ser utilizada para outros fins. Ainda vale a pena ressaltar que, os animais dos grupos (N+Lev e D+Lev) que receberam a levana, apresentaram comportamento mais calmo e não agressivo quando manuseados, podendo inferir que ocorreu uma mudança no comportamento dos animais, já que os animais que não receberam levana, principalmente os diabéticos, emitiam comportamentos de estresse, como morder, arranhar e grunhidos.

Conclusão

A levana utilizada neste trabalho não proporcionou nenhuma melhora no quadro de diabetes dos animais durante o experimento, porém não interferiu no metabolismo de forma geral, atestando sua legitimidade como composto não tóxico, podendo ser utilizada para outros fins. Ademais, é importante considerar as mudanças comportamentais observadas nos ratos que receberam levana, porém são necessários estudos específicos que comprovem este efeito.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES – Brasil pelo suporte financeiro fornecido na realização deste trabalho.

Referências

- ABDEL-FATTAH, A. F.; MAHMOUND, D. A. R.; ESAWY, M. A. T. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and Enzymic Synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology*, v. 51, p. 402 - 407, 2005.
- BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKEVICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, E.; UPITE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levan Ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 979-986, 2001.
- BOLKENT, S.; YANARDAG, R.; TABAKOGLU-OGUZ, A.; ÖZSOY-SAÇAN, Ö. Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) extract on pancreatic B cells in streptozotocin-diabetic rats: a morphological and biochemical study. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 251–259, 2000.
- CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R. C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 27, p. 245 - 247, 2000.
- CHEN, X.; LIU, Y.; BAI, X.; WEN, L.; FANG, J.; YE, M.; CHEN, J. HYPOGLYCEMIC Polysaccharides from the Tuberous Root of *Liriope spicata*. *Journal of Natural Products*, v. 72, 1988 - 1992, 2009.
- DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H.; DOELLE, M. B. *Zymomonas mobilis*-Science and Industrial Application. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 13, p.57-98, 1993.
- EL-GAWAD, I. A. A.; EL-SAYED, E.M.; HAFEZ, S. A.; EL-ZENINI, H. M.; SALEH, F. A. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *International Dairy Journal*, v. 15, p. 37-44, 2005.
- 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 Biotechnology*, v.25, p.821–827, 2009.
- 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.
- GUPTA, S. K.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; DALVI, R.; KUMAR, V.; MUKHERJEE, S. C. Microbial levan in the diet of Labeo rohita Hamilton juveniles: effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, v. 31, p. 649 - 657, 2008.
- HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. production and characterization of microbial levan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.38, p.393-396, 1990.
- HWANG, H. J.; KIM, S. W.; LIM, J. M.; JOO, J. H.; KIM, H. O.; KIM, H. M.; YUNT, J. W. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, v.76, p. 3069–3080, 2005.
- KANG, S. A. HONG, K.; JANG, K. H.; KIM, Y. Y; CHOUE, R.; LIM, Y. Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.17, p. 419 - 426, 2006.

- KUZUYA, T.; NAKAGAWA, S.; SATOH, J.; KANAZAWA, Y.; WAMOTO, Y.; KOBAYASHI, M. *et al.* Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practices*, v.55, p.65-85, 2002.
- LI, S. P.; ZHANG, G. H.; ZENG, Q.; HUANG, Z. G.; WANGS, Y. T.; DONG, T. T. X.; TSIM, K. W. K. Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidant, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine*, v. 13, p. 428 - 433, 2006.
- LIU, J.; ZHANG, J. XIA, W. Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry*, v. 107, p. 419 - 425, 2008.
- LUO, Q.; YIZHONG, C.; YAN, J.; SUN, M.; CORKE, H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sciences*, v. 76, p. 137 - 149, 2004.
- MELO, I. R.; PIMENTEL, M. F.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p. 45-51, 2007.
- MENG, G.; FÜTTERER, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology*, v.10, p. 953-941, 2003.
- MIRANDA, C. C. B. O. Produção de botriosferana e avaliação de suas atividades mutagênica, antimutagênica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica. Londrina: UEL, 2006, 185p. Dissertação do programa de mestrado em Biotecnologia – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina.
- OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal*, v. 37, p.177–183, 2007.
- RYAN, K. J.; RAY C. G. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed. McGraw Hill, 2004.
- 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.
- 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.
- SHU, C. H.; LUNG, M. Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharides by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochemistry*, v.39, p.931-937, 2004.
- TONG, H.; LIANG, Z.; WANG, G. Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 316–323, 2008.
- TZANG, B. S.; YANG, S. F.; FU, S. G.; YANG, H. G.; SUN, H. L.; CHEN, Y. C. Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. *Food Chemistry*, v. 140, p. 1450 - 1455, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://apps.who.int/en/>. Acesso em: 17 de Junho, 2009.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y.; KAWANO, M.; IIZUKA, M.; MATSUMOTO, T.; SAEKI, S.; YAMAGUCHI, H. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 10, p.13 -18, 1999.

YAO, H-T., HUANG, S-Y.,CHIANG, M-T. A comparative study on hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of high and low molecular weight chitosan in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 1525 - 1534, 2008.

YOO, S-H.; YOON, E. J.; CHA, J.; LEE, H. G. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 34 p. 37- 41, 2004.

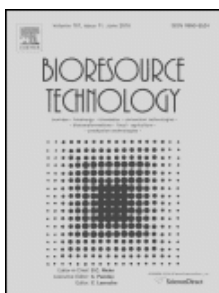
ZHANG, R.; ZHOU, J.; JIA, Z.; ZHANG, Y.; GU, G. Hypoglycemic effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide in hyperglycemic and alloxan-induced diabetic rats and its mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, p. 39 - 43, 2004.

ZOU, S.; ZHANG, X.; YAO, W.; NIU, Y.; GAO, X. Structure characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. *Carbohydrate Polymer*, In Press, 2010.

ANEXO C

Normas para a submissão do artigo para o periódico *Bioresource Technology* (ISSN: 09608524), disponível em:

- <http://journals.elsevier.com/09608524/bioresource-technology/>



Bioresource Technology

Editor-in-Chief: Ashok Pandey

ISSN: 09608524

Imprint: ELSEVIER

Impact Factor: 4.253

5-Year Impact Factor: 4.742

Issues per year: 24

Description

Bioresource Technology publishes original articles, review articles, case studies and short communications on the fundamentals, applications and management of bioresource technology. The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas of biomass, biological waste treatment, bioenergy, biotransformations and bioresource systems analysis, and technologies associated with conversion or production.

Topics include:

- Biofuels: liquid and gaseous biofuels production, modeling and economics
- Bioprocesses and bioproducts: biocatalysis and fermentations
- Biomass and feedstocks utilization: bioconversion of agro-industrial residues
- Environmental protection: biological waste treatment
- Thermochemical conversion of biomass: combustion, pyrolysis, gasification, catalysis

For more details, authors should consult the Subject Classifications in the Guide for Authors. The Journal does not consider articles dealing with crop cultivation, breeding and agronomy, plant extracts and enzymes, composites, marine organisms (except microorganisms and algae for bioprocesses), soil and air pollution, and performance of fuel combustion in engines.

Audience

Biotechnologists, applied microbiologists, chemical and biochemical engineers, process technologists, agro-industrial waste management technologists.

Impact Factor

2009: 4.253 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2010

Guide for Authors

Introduction

Bioresource Technology publishes original articles, review articles, case studies and short communications on the fundamentals, applications and management of bioresource technology. The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas of biomass, biological waste treatment, bioenergy, biotransformations and bioresource systems analysis, and technologies associated with conversion or production.

Topics include:

- Biofuels: liquid and gaseous biofuels production, modeling and economics
- Bioprocesses and bioproducts: biocatalysis and fermentations
- Biomass and feedstocks utilization: bioconversion of agro-industrial residues
- Environmental protection: biological waste treatment
- Thermochemical conversion of biomass: combustion, pyrolysis, gasification, catalysis

For more details, authors should consult the Subject Classifications in the Guide for Authors. The journal does not consider articles dealing with crop cultivation, breeding and agronomy, plant extracts and enzymes, composites, marine organisms (except microorganisms and algae for bioprocesses), soil and air pollution, and performance of fuel combustion in engines.

Types of paper

When submitting a manuscript to the journal, authors must choose one or more classifications that best describe their manuscript. A list of classifications can be found here *Submission of papers*:

Papers from all over the World: Please use Elsevier's online submission system to submit to the journal. The direct link is <http://ees.elsevier.com/bite/>

Covering letter to the editor:

When submitting the manuscript, it is mandatory to include a covering letter to the editor. The covering letter must state:

- (1) Subject Classification selected from the list (see guide for authors and select the most suitable ONE ONLY).
- (2) That all the authors mutually agree that it should be submitted to BITE.
- (3) It is the original work of the authors.
- (4) That the manuscript was not previously submitted to BITE.
- (5) State the novelty in results/findings, or significance of results.

Types of contributions: Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews. Review articles would be generally solicited by the editors from the experts. However, these can be contributed by others also. In this case, authors must consult the editor by sending the extended summary (300-400 words), outline and the list of publications of authors on the topic.

PREPARATION

Manuscript Preparation

General:

Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of uniformity.

Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure Captions, Tables and Figures. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Text Layout:

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

Page length: Maximum page length should be 15, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor 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 wordprocessor's AUTHOR INFORMATION PACK 15 Jan 2011 www.elsevier.com/locate/biortech 7 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: <http://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 illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

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.

Material and methods

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.

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.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results and Discussion

Results should be clear and concise. Discussion should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions drawn from results should be presented in a short Conclusions section (maximum 100 words).

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 and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***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, if available, the e-mail address of each author.

AUTHOR INFORMATION PACK 15 Jan 2011 www.elsevier.com/locate/biortech 8

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing 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. Each paper should be provided with an abstract of about 100-150 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

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 file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords to be included in an article, 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.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field 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.

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.).

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

Present simple formulae in the line of 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, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

AUTHOR INFORMATION PACK 15 Jan 2011 www.elsevier.com/locate/biortech 9

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork**Electronic artwork****General points**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

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

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

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

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, 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: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- 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, EPS 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 on the Web (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 on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical

complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. 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. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6. The Journal discourages publication of simple one line graphs/figures, pattern figures, conventional spectra (X-ray, FTIR, UV, NMR, etc) and SEM photographs of a routine nature.

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. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. The Journal discourages publication of simple one parameter tables; such information should be preferably described in the text itself.

AUTHOR INFORMATION PACK 15 Jan 2011 www.elsevier.com/locate/biortech 10

References

Maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research paper/case study and review papers, respectively.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in

the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

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 style

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;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al.(2000) have recently shown"

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., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

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 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 50 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 <http://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 data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should

submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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 designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

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

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" 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>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):
doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Publication of Articles

After acceptance the Journal will publish articles quickly both online and in print. Requests for delayed publication of the accepted articles are generally not acceptable.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or AUTHOR

INFORMATION PACK 15 Jan 2011 www.elsevier.com/locate/biortech 12 higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe

site: <http://www.adobe.com/products/reader/systemreqs>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. 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. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your 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. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at

<http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after

acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

© Copyright 2010 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO D

Normas para a submissão do artigo para a revista Semina: Ciências Biológicas e da Saúde (ISSN: 0101-3742), disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/index>



Semina: Ciências Biológicas e da Saúde

Editor-in-Chief: Oscar Akio Shibatta

ISSN: 0101-3742

ISSN Print: 1679-5435

EISSN: 1679-0367

Descrição

A Revista **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde** é uma publicação semestral de divulgação científica e tecnológica vinculada à Universidade Estadual de Londrina. Publica artigos originais e artigos de revisão, relatos de casos ligados à grande área das Ciências Biológicas e da Saúde.

Diretrizes para Autores

Normas Editoriais para Publicação

Apresentação dos Trabalhos

1. Os originais devem ser enviados pelo SEEr (Sistema de Editoração Eletrônica de Revistas). O trabalho deverá ser elaborado no editor de texto Microsoft Word for Windows, entrelinhamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11, normal; com margens de no mínimo 2cm, respeitando-se o número de páginas de acordo com a categoria do trabalho e devem estar devidamente numeradas.
2. Categorias dos Trabalhos:

- a) artigos e revisões no máximo 40 páginas;
 - b) comunicações; divulgações e resenhas no máximo 20 páginas;
 - c) resenhas de livros e revistas no máximo 4 páginas; e
3. Na primeira lauda do original deverá constar o título do trabalho; categoria do trabalho; área de publicação da Semina e classificação das áreas/sub-áreas do CNPq/CAPEs.
- 3.1. *Título do trabalho*: o título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto.
- 3.2. *Resumo*: deve ser incluído um resumo informativo de aproximadamente 200 palavras, em português, acompanhado de sua tradução para o inglês, digitado com entrelinhamento duplo, na segunda lauda do original. (NBR 6028 da ABNT)
- 3.3. *Agradecimentos*: agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo.
- 3.4. *Notas*: notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um asterisco alto, imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé do texto.
- 3.5. *Apêndices*: apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.
- 3.6. *Materiais gráficos*: fotografias nítidas e gráficos (estritamente indispensáveis à clareza do texto) poderão ser aceitos e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, os locais onde devem ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.
- 3.7. *Quadros e Tabelas*: os quadros e/ou tabelas deverão ser acompanhados de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto. Assinalar, no texto, por seu número de ordem, os locais onde os quadros e/ou tabelas devem ser intercalados.
- 3.8. As grandezas, unidades e símbolos deverão obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).
- 3.9. *Citações*: deverão seguir o sistema de chamada alfabética (NBR 10520 da ABNT).

- 3.10. *Referências bibliográficas*: as referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são da responsabilidade do autor.
4. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na SEMINA, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.
 5. A publicação dos trabalhos depende de parecer da Assessoria Científica "*Ad hoc*" da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL.
 6. Após impressa a revista, o autor principal receberá gratuitamente um (1) exemplar da revista.
 7. Os trabalhos não aceitos para publicação serão devolvidos ao autor.
 8. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

Itens de Verificação para Submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. **Foram preenchidos dados de autoria de todos os autores no processo de submissão.**
Utilize o botão "incluir autor"
3. **Foram preenchidos os metadados em inglês (Title, abstract and key words)**

Para incluí-los, depois de salvar os dados de submissão em português, clicar em "**editar metadados**" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: título em inglês, abstract e key words.

4. A identificação de autoria do trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação Cega por Pares.
5. O texto está em espaço 1,5; usa Times New Roman, tamanho 11; com margem de 2 cm, emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento, como anexos.
6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.
7. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)
8. URLs para as referências foram informadas quando necessário.

Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude de aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário. Nesses casos, os artigos, depois de adequados, deverão ser submetidos a nova apreciação.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.