



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LEANDRO FREIRE DOS SANTOS

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DA LEVANA DE *Bacillus subtilis* NATTO EM FILMES ISOLADOS PARA LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DE FÁRMACOS**

LEANDRO FREIRE DOS SANTOS

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DA LEVANA DE *Bacillus subtilis* NATTO EM FILMES ISOLADOS PARA LIBERAÇÃO  
CÓLON-ESPECÍFICA DE FÁRMACOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia, área Agroindustrial.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonia  
Pedrine Colabone Celligoi

Co-orientador: Prof. Dr. Osvaldo Albuquerque  
Cavalcanti

Londrina  
2010

LEANDRO FREIRE DOS SANTOS

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DA LEVANA DE *Bacillus subtilis* NATTO  
EM FILMES ISOLADOS PARA LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DE  
FÁRMACOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia, área Agroindustrial.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Márcia Portilho  
UEM – Maringá - PR

---

Prof. Dr. João Batista Buzato  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 01 de março de 2010

Dedico este trabalho aos meus pais e a Deus.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Cláudio e Branca pelo amor, suporte financeiro e emocional.

Ao meu irmão e cunhada, Tiago e Monica pelas horas compartilhadas, as brincadeiras e a amizade.

Aos meus estimados orientadores Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi e Prof. Dr. Osvaldo Albuquerque Cavalcanti por todo suporte, conselhos, ensinamentos e pelo bom convívio durante a construção deste trabalho.

Ao Paulo, Nelson e Lucivana, pela competência profissional e atenção.

Aos queridos amigos do mestrado, Anelize, Cristina, Leandra, Letícia, Luciana, Rafael, Thaís e Vanessa, pela companhia na conclusão dos créditos, apresentação de seminários, viagens e conversas.

Aos queridos amigos do laboratório, Elaine, Siliane, Adriano, Bruno e Marcela pelo compartilhamento de materiais e conhecimento.

Ao professor Wagner José Martins Paiva do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina pelas contribuições nas análises de MTT e micronúcleo.

Ao professor Edgardo Alfonso Gómez Pineda do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá pelas contribuições nas análises de DSC e TGA.

Ao professor Dionísio Borsato do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina pelas contribuições nas análises estatísticas.

Às professoras Marcela Maria Baracat e Geni Varéa Pereira pelas sugestões na qualificação.

Aos professores João Batista Buzato e Márcia Portilho pelas sugestões na defesa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida, fato este que possibilitou a viabilização deste trabalho.

A todos aqueles que se fizeram presentes, que foram solidários e que torceram por mim.

“Tudo passa sobre a terra”

**José de Alencar**

SANTOS, Leandro Freire dos. **Produção e aplicação da levana de *Bacillus subtilis* NATTO em filmes isolados para liberação cólon-específica de fármacos**. 2010. 145 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

## RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de apresentar a levana como candidata na elaboração de um novo material polimérico conjuntamente com o Eudragit FS 30D<sup>®</sup> e RS 30D<sup>®</sup>. Filmes cólon-específicos, a base de polímeros metacrilatados, possuem maior controle na liberação do ativo quando aditivados de um prebiótico; melhorando a terapêutica de patologias colônicas. Paralelamente ao objetivo principal, o estudo buscou otimizar a produção de levana pelo *Bacillus subtilis* NATTO e caracterizá-la, bem como caracterizar os filmes produzidos. A condição ótima de produção de levana, pela análise fatorial e metodologia de superfície de resposta, foi obtida utilizando-se 400 g/L de sacarose com 16 h de tempo de cultivo; com a produção de 111,6 g/L. A levana produzida apresentava duas faixas de massas molares, aproximadamente 568 KDa e < 50 KDa; nas quantidades 13,39% e 86,61%, bem como apresentava um comportamento Newtoniano. A levana também se apresentou não citotóxica e não mutagênica para células de ovário de hamster chinês nas diferentes concentrações de levana testadas. As películas isoladas confeccionadas forneceram subsídios iniciais promissores quanto ao futuro revestimento de fármacos na qual se deseja absorção colônica.

**Palavras chaves:** Levana. *Bacillus subtilis*. Filmes. Eudragit FS 30D. Eudragit RS 30 D.



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Principais doenças colônicas, sintomas e tratamento farmacológico utilizado (JAIN, GUPTA e JAIN, 2006).....   | 37 |
| <b>Tabela 2</b> – Delineamento fatorial completo $3^2$ para avaliar os efeitos das variáveis tempo de cultivo ( $X_1$ ) e concentração de sacarose ( $X_2$ ) na produção de levana por <i>B. subtilis</i> NATTO .....                       | 51 |
| <b>Tabela 3</b> – Delineamento fatorial fracionário $2^2$ com pontos estrela para avaliar os efeitos das variáveis tempo de cultivo ( $X_1$ ) e concentração de sacarose ( $X_2$ ) na produção de levana por <i>B. subtilis</i> NATTO ..... | 52 |
| <b>Tabela 4</b> – Quantidade de polímeros e levana usados para um volume de 100 mL de filme .....   | 59 |

### Artigo A

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Planejamento fatorial completo ( $3^2$ ) para investigar o efeito do tempo de cultivo ( $X_1$ ) e a concentração de sacarose ( $X_2$ ) na produção de levana por <i>B. subtilis</i> NATTO ..... | 73 |
| <b>Tabela 2</b> – Análise de variância (ANOVA) e o efeito da concentração de sacarose ( $X_1$ ) e tempo de fermentação ( $X_2$ ) na produção de levana por <i>B. subtilis</i> NATTO .....                         | 74 |
| <b>Tabela 3</b> – Delineamento central composto e estrela para avaliar a produção de levana (g/L) por <i>B. subtilis</i> NATTO .....  | 75 |
| <b>Tabela 4</b> – Avaliação da mutagenicidade da levana, produzida por <i>B. subtilis</i> NATTO, em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) .....  | 80 |

### Artigo B

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Índice de intumescimento das formulações EFL em fluido de simulação gástrico (média dos dados $\pm$ S.D.; n=3)..... | 94 |
|---|----|

## Artigo C

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1</b> – Índice de intumescimento das formulações ERL em fluido de simulação gástrico (FSG) e intestinal (FSI) (média dos dados $\pm$ S.D.; n=3) ..... | 110 |
|---|-----|

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Estrutura linear da levana e suas ramificações. Ligações principais do tipo $\beta$ (2-6) e ramificações ( $\beta$ 2-1) (SIMMS, BOKYO e EDWARDS, 1990)..... | 20 |
| <b>Figura 2</b> – Diagrama representativo do cólon (MERCK, 1996).....   | 33 |
| <b>Artigo A</b>   |    |
| <b>Figura 1</b> – Superfície de resposta mostrando os efeitos do tempo (h) e concentração de sacarose (g/L) na produção de levana por <i>B. subtilis</i> NATTO .....          | 74 |
| <b>Figura 2</b> – Análise dos hidrolisados de levana de <i>B. subtilis</i> NATTO por cromatografia líquida de alta pressão em coluna de troca aniônica (HPAEC) .....          | 77 |
| <b>Figura 3</b> – Viscosidade de solução aquosa de levana (33,1%) de <i>B. subtilis</i> NATTO a 25°C. ....  | 78 |
| <b>Figura 4</b> – Citotoxicidade das células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) frente a diversos tratamentos de levana seguido por 24 h de incubação .....                 | 79 |
| <b>Artigo B</b>   |    |
| <b>Figura 1</b> – Transmissão do vapor de água dos filmes nas diferentes associações – Eudragit FS30D e levana (n=3) de <i>B. subtilis</i> NATTO .....                        | 93 |
| <b>Figura 2</b> – Curvas da calorimetria diferencial de varredura das diferentes associações Eudragit FS 30D: Levana a) EF100% b) EFL 95:05 c) EFL 90:10 d) EFL 80:20 .....   | 95 |
| <b>Figura 3</b> – Curvas de termogravimetria dos filmes isolados Eudragit FS30D <sup>®</sup> aditivados com levana de <i>B. subtilis</i> NATTO .....                          | 96 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 4</b> – Curvas termogravimétricas derivadas das diferentes associações de filmes Eudragit FS 30 D: Levana: a) EF 100, b)EFL 95:05, c) EFL 90:10 e d) EFL 80:20 ..... | 97 |
|--|----|

### **Artigo C**

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 1</b> – Transmissão do vapor de água dos filmes nas diferentes associações – Eudragit RS30D e levana de <i>B. subtilis</i> NATTO (n=3).....                        | 109 |
| <b>Figura 2</b> – Curvas da calorimetria diferencial de varredura das diferentes associações Eudragit RS 30D: Levana a) ER 100% b) ERL 95:05 c) ERL 90:10 d) ERL 80:20 ..... | 111 |
| <b>Figura 3</b> – Curvas da termogravimetria dos filmes isolados Eudragit RS30D <sup>®</sup> aditivados com levana de <i>B. subtilis</i> NATTO.....                          | 112 |
| <b>Figura 4</b> – Curvas de termogravimetria derivada das diferentes associações de filmes Eudragit RS 30 D: Levana: a)ER 100, b)ERL 95:05, c)ERL 90:10 e d)ERL 80:20 .....  | 113 |

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>ANOVA</b>         | Análise de Variância  |
| <b>DSC</b>           | Calorimetria Diferencial de Varredura                             |
| <b>DTG</b>           | Termogravimetria derivada   |
| <b>EF</b>            | Eudragit FS 30 D <sup>®</sup>                                     |
| <b>EFL</b>           | Eudragit FS 30 D <sup>®</sup> aditivado com levana                |
| <b>EPS</b>           | Exopolissacarídeo   |
| <b>ER</b>            | Eudragit RS 30 D <sup>®</sup>                                     |
| <b>ERL</b>           | Eudragit RS 30 D <sup>®</sup> aditivado com levana                |
| <b>FSG</b>           | Fluído de Simulação Gástrica                                      |
| <b>FSI</b>           | Fluído de Simulação Intestinal                                    |
| <b>HPAEC</b>         | Cromatografia Líquida de Alta Pressão em Coluna de Troca Aniônica |
| <b>li%</b>           | Índice de Intumescimento  |
| <b>MEG</b>           | Monoestearato de glicerila  |
| <b>MTT</b>           | brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)      |
| <b>PBS</b>           | Tampão fosfato  |
| <b>t<sub>d</sub></b> | Temperatura de relaxação  |
| <b>TEC</b>           | Citrato de trietila   |
| <b>tg</b>            | Temperatura de Transição Vítrea                                   |
| <b>t<sub>m</sub></b> | Temperatura de degradação   |
| <b>TGA</b>           | Termogravimetria  |
| <b>TGI</b>           | Trato gastrintestinal   |
| <b>TVA</b>           | Transmissão de Vapor d`água                                       |
| <b>USP 23</b>        | Farmacopéia dos Estados Unidos da América 23 <sup>a</sup> Ed.     |

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>  | 16 |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>   | 18 |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL   | 18 |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 18 |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>   | 19 |
| 3.1      | LEVANA   | 19 |
| 3.1.1    | Produção de Levana   | 21 |
| 3.1.2    | Aplicação dos Exopolissacarídeos   | 25 |
| 3.2      | LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS   | 29 |
| <b>4</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>   | 42 |
| 4.1      | MATERIAIS  | 42 |
| 4.1.1    | Microrganismo  | 42 |
| 4.1.2    | Meios de Cultura   | 42 |
| 4.1.2.1  | Meio de preservação (Ágar nutriente)   | 42 |
| 4.1.2.2  | Meio para obtenção do pré – inóculo (CALAZANS et al., 2000)  | 43 |
| 4.1.2.3  | Meio de fermentação (EUZENAT, GUILBERT e COMBES, 1996)   | 43 |
| 4.1.3    | Ensaio de Citotoxicidade e Mutagenicidade  | 44 |
| 4.1.3.1  | Cultivo celular  | 44 |
| 4.1.3.2  | Meio de cultura  | 44 |
| 4.1.3.3  | Solução salina balanceada (PBS) livre de Ca <sup>2+</sup> e Mg <sup>2+</sup>                       | 45 |
| 4.1.3.4  | Solução balanceada salina de Hanks sem Ca <sup>2+</sup> e Mg <sup>2+</sup>                         | 45 |
| 4.1.3.5  | Tripsina EDTA 0,025%   | 46 |
| 4.1.3.6  | Solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium<br>bomídico) (Sigma®) 3,33 g/mL | 46 |
| 4.1.3.7  | Citocalasina 300µg/mL  | 47 |
| 4.1.3.8  | Solução Hipotônica de Citrato de Sódio 3,4.10 <sup>-2</sup> M                                      | 47 |
| 4.1.3.9  | Fixador Metanol-Ácido Acético 3:1  | 47 |
| 4.1.4.0  | Tampão de Sorensen   | 48 |
| 4.1.4.1  | Giemsa   | 48 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.1.4.2  | Corante final de Giemsa 5% .....   | 49        |
| 4.1.5    | Materiais para Formação e Análise dos Filmes.....  | 49        |
| 4.2      | MÉTODOS .....  | 49        |
| 4.2.1    | Preservação do Microrganismo .....   | 49        |
| 4.2.2    | Pré – Inóculo .....  | 50        |
| 4.2.3    | Produção de Levana através do Planejamento Fatorial e Análise por<br>Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....          | 50        |
| 4.2.4    | Fermentação em Escala Maior.....   | 52        |
| 4.2.5    | Tratamento do Fermentado com Protease.....   | 53        |
| 4.2.6    | Precipitação e Liofilização da Levana.....   | 53        |
| 4.2.7    | Quantificação da Levana .....  | 53        |
| 4.2.8    | Estimativa da Massa Molar da Levana por Cromatografia de Exclusão<br>Molecular .....   | 54        |
| 4.2.9    | Composição dos Monossacarídeos da Levana por Cromatografia<br>Líquida de Alta Pressão em Coluna de Troca Aniônica (HPAEC)..... | 54        |
| 4.2.10   | Determinação da Viscosidade da Levana Produzida pelo B. subtilis<br>NATTO.....   | 55        |
| 4.2.11   | Meio de Cultura para Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO-<br>K1) nos Testes de Toxicidade da Levana .....                 | 55        |
| 4.2.12   | Descongelamento das Células CHO-K1 .....   | 56        |
| 4.2.13   | Repique e Manutenção das Células .....   | 56        |
| 4.2.14   | Citotoxicidade: Teste do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-<br>Difeniltetrazólio) (MTT) .....                          | 56        |
| 4.2.15   | Mutagenicidade: Teste do Micronúcleo .....   | 57        |
| 4.2.16   | Preparação dos Filmes .....  | 58        |
| 4.2.17   | Caracterização Morfológica Macroscópica e Determinação da<br>Espessura dos Filmes.....   | 60        |
| 4.2.18   | Transmissão de Vapor d`água (TVA) .....  | 60        |
| 4.2.19   | Determinação do Índice de Intumescimento (Ii%).....  | 61        |
| 4.2.20   | Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....   | 62        |
| 4.2.21   | Análise Termogravimétrica (TGA).....   | 62        |
| 4.2.22   | Análise Estatística.....   | 63        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>   | <b>64</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 5.1 PRODUÇÃO DA LEVANA .....   | 64         |
| <b>ARTIGO A – CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA E OTIMIZAÇÃO DA SUA PRODUÇÃO PELO BACILLUS SUBTILIS NATTO. EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE .....</b>   | <b>66</b>  |
| <b>ARTIGO B – LEVANA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVO MATERIAL POLIMÉRICO: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE, HIDRATAÇÃO E ANÁLISES TÉRMICAS EM FILMES ISOLADOS DE EUDRAGIT FS30D® .....</b>   | <b>84</b>  |
| <b>ARTIGO C – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE, HIDRATAÇÃO E ANÁLISES TÉRMICAS DE FILMES ISOLADOS DE EUDRAGIT RS 30D® ADITIVADOS COM LEVANA DE BACILLUS SUBTILIS NATTO. MATERIAL CANDIDATO AO REVESTIMENTO FARMACÊUTICO .....</b> | <b>101</b> |
| <b>CONCLUSÕES .....</b>  | <b>117</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>118</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>  | <b>129</b> |
| ANEXO A – Relatório Técnico: Identificação de microrganismos – coleção de culturas tropicais – André Tosello – Campinas, SP.....   | 130        |
| ANEXO B – Curva de calibração da solução padrão de frutose por Somogyi (1954) e Nelson (1944) em 540 nm .....  | 134        |
| ANEXO C – Curva de calibração da cromatografia de exclusão molecular com padrões de leuconsotoc mesenteroides Sigma de 50.000, 410.000 e 670.000 Da.....   | 135        |
| ANEXO D – Perfil de eluição da amostra.....  | 136        |
| ANEXO E – Instruções e normas para o encaminhamento e publicação do Artigo no periódico Food Microbiology .....  | 137        |



|   |     |
|---|-----|
| ANEXO F – Instruções e normas para o encaminhamento e publicação do<br>Artigo no periódico Applied Microbiology and Biotechnology e<br>World Journal of Microbiology and Biotechnology..... | 142 |
|---|-----|

## 1 INTRODUÇÃO

É de grande interesse em biotecnologia a pesquisa e o desenvolvimento de sistemas inovadores de liberação modificada de fármacos. Tais sistemas para liberação modificada de fármacos oferecem ao paciente um melhor gerenciamento na liberação do medicamento; melhorando a resposta terapêutica de substâncias farmacologicamente ativas, bem como a redução dos seus efeitos adversos (SINHA et al., 2004). Exopolissacarídeos têm se destacado, nos últimos anos, no desenvolvimento de novos sistemas de liberação modificada de fármacos. Sinha, Mittal e Kumria (2005) desenvolveram e avaliaram um processo de revestimento por compressão à base de xantana; um exopolissacarídeo produzido por fermentação da bactéria *Xanthomana campestris*.

Há uma ampla variedade de sistemas de liberação modificada de fármacos utilizados na indústria farmacêutica. Nestes sistemas incluem-se os lipossomas, nano e micropartículas, microesferas biodegradáveis, bombas osmóticas, filmes cólon-específicos, sistemas transdérmicos, pró-fármacos, sistemas poliméricos matriciais, entre outros (DELUCIA, 2007).

Apesar da crescente aplicabilidade dos exopolissacarídeos em diversos dispositivos de liberação modificada, pouco se tem estudado quanto à sua aplicação num dispositivo em específico: filmes isolados para liberação cólon-específica de fármacos. Estes filmes apresentam em sua composição um polímero pH - dependente ou tempo - dependente aditivado com algum substrato que é biodegradado especificamente pela microflora colônica e que, conseqüentemente, auxilia na liberação do medicamento no cólon. A garantia que o substrato será atacado, apenas na região colônica, é que este é constituído de uma microflora única e complexa, abrigando mais de 500 espécies bacterianas; com crescimento ostensivo de microrganismos anaeróbicos (QUINTANILHA et al., 2007).

A levana, uma frutana de ligações  $\beta$  (2  $\rightarrow$  6) e ramificações  $\beta$  (2  $\rightarrow$  1), produzida com um bom rendimento pelo *B. subtilis* NATTO e diversos outros microrganismos (EUZENAT, Guilbert e Combes, 1996), apresenta-se com excelente perspectiva para a aditivação de películas destinadas à liberação controlada no ambiente colônico devido às suas características físico-químicas de biodegradabilidade colônica (PAULA et al., 2008).

Dentre as patologias, acometidas no ambiente colônico, que podem se beneficiar pelo uso de filmes para liberação cólon-específica são: síndrome do intestino irritável, câncer cólon-retal, doença de Crohn e colite ulcerativa (FRIEND, 2005; OLIVEIRA, 2006). As formulações farmacêuticas disponíveis, atualmente, para tratamento destas doenças são: formulações orais de liberação lenta ou enemas de uso retal. Estes tratamentos tradicionais não são, normalmente, sítio – específicos e tem alta frequência de efeitos colaterais (JAIN, GUPTA e JAIN 2007).

Outras substâncias que se beneficiarão pelo revestimento de películas cólon – específicas são hormônio do crescimento, insulina, endorfinas e calcitonina. Estas substâncias não suportam o ambiente inóspito das regiões proximais do trato gastrointestinal; estômago e intestino delgado. Estas regiões apresentam grande variação do pH, secreção de sais biliares e enzimas digestivas (DUPUIS et al., 2006). Ao contrário das características inóspitas do trato superior gastrointestinal, o ambiente colônico apresenta pH próximo do neutro, tempo lento de trânsito intestinal, baixa atividade enzimática proteolítica (TUOHY et al., 2003).

Considerando a alta produtividade da levana pelo *B. subtilis* NATTO e a biodegradabilidade desse exopolissacarídeo no ambiente colônico, aliado a necessidade de maiores estudos dos filmes cólon-específicos para trazer melhoras no tratamento de certas doenças; este trabalho tem o objetivo de aplicar um exopolissacarídeo de frutose (levana de *B. subtilis* NATTO) em filmes para liberação controlada no cólon.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar parcialmente a levana de *B. subtilis* NATTO e aplicá-la no desenvolvimento de novos materiais poliméricos: Filmes isolados para liberação cólon-específica de fármacos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Otimizar a produção de levana através do planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta.
- 2.2.2 Estimar a massa molar da levana por cromatografia de exclusão molecular.
- 2.2.3 Avaliar a composição da levana por cromatografia de alta pressão em coluna de troca aniônica.
- 2.2.4 Realizar uma caracterização reológica parcial da levana.
- 2.2.5 Avaliar a citotoxicidade e mutagenicidade da levana produzida.
- 2.2.6 Produzir e caracterizar os filmes cólon-específicos aditivados com levana por transmissão de vapor de água, índice de intumescimento e análises térmicas (DSC e TGA).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LEVANA

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos que podem ser amplamente produzidos por diferentes microrganismos. Os polissacarídeos extracelulares, ou exopolissacarídeos, podem ser excretados diretamente para o meio de cultura sob a forma de muco, ou então encontrar-se na forma de camada aderente à volta da parede celular a qual denomina-se cápsula (SUTHERLAND, 1972).

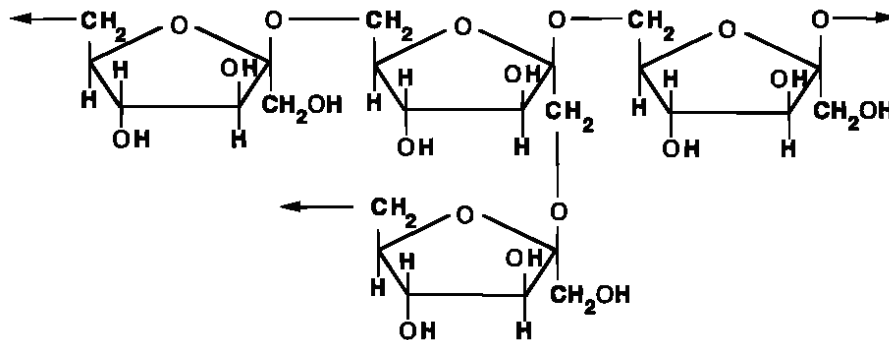
A levana é um polissacarídeo extracelular constituída predominantemente por resíduos de D-frutose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6); podendo ainda apresentar pontos de ramificações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) e um resíduo de glucose terminal (ARVIDSON, RINEHART e GADALA-MARIA, 2006). Pode ser classificada como fruto-oligossacarídeo quando é constituída por uma cadeia curta de resíduos de D-frutose. É encontrada principalmente em microrganismos gram positivos, embora alguns gram negativos a produzam (SACHA et al, 2001). Há relatos da presença de levana em plantas (MALLEUX e VAN DEN ENDE, 2007).

A levana é um biopolímero com alta estabilidade. Bekers et al. (2005) estudaram a estabilidade da levana, produzida pela *Zymomonas mobilis*, em diferentes pH's e temperaturas; em meio líquido. Esses autores objetivaram avaliar a integridade do EPS em culturas líquidas sob diferentes condições, bem como estudar o comportamento hidrolítico da levana. A levana não foi degradada quando estocada por 120 h a 25 ou 30°C, porém a 55 ou 60°C sua degradação foi inversamente proporcional ao pH. A hidrólise com ácidos orgânicos (lático, acético e glucônico) asseguraram maior formação de monômeros de frutose; enquanto que a hidrólise da levana por HCl assegurou altas quantidades de fruto-oligossacarídeos e levana de baixa massa molar. A produção metabólica da levana acompanha a curva de crescimento da biomassa (SHIH et al., 2005).

A levana apresenta-se como prebiótico. Os prebióticos são alimentos não digeríveis e que estimulam o crescimento e a atividade metabólica das bactérias colônicas, presentes no intestino grosso. A levana é produzida, pelos

microrganismos, como forma de reserva energética e defesa. Apresenta ainda baixa viscosidade e alta solubilidade em água. (BORSARI et al., 2006; DE PAULA et al., 2008).

A levana é formada através das reações de transfrutossilação catalisadas pela levanasacarase (sacarose: 2,6 –  $\beta$  D frutana: 6  $\beta$  D frutossil transferase: EC. 2.4.1.10). Os resíduos frutofuranosil, da sacarose, são transferidos para uma frutose como aceitador. Esta transferência ocorre por meio da formação de ligações entre o carbono 2, do resíduo frutofuranosil, e o carbono 6 da frutose (YAMAMOTO et al., 1984). Neste estudo ainda, um parâmetro foi essencial para a determinação da massa molar da levana; a força iônica. A supressão da força iônica foi observada como condição para a síntese de levana de alta massa molar. Gorrec et al. (2002) atribuíram três atividades para a levanasacarase; frutossiltransferase, sacarase e fruto-polimerase. Abdel-Fattah, Mahmoud e Esawy (2005) verificaram que a levanasacarase é produzida de modo induzível e era constitutiva, no *Bacillus subtilis* NRC 33a, quando usado sacarose e glucose como fontes de carbono respectivamente.



**Figura 4** – Estrutura linear da levana e suas ramificações. Ligações principais do tipo  $\beta$  (2-6) e ramificações ( $\beta$  2-1) (SIMMS, BOKYO e EDWARDS, 1990)

Diversos microrganismos se destacam pela produção de levana, dentre eles *Erwinia herbicola*, *Erwinia amylovora*, *Acetobacter suboxydans*, *Gluconobacter oxydans*, *Rhanella aquatilis*, *Bacillus subtilis* NATTO, *Actinomyces viscosus*, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyia*, *Aerobacter*

*levanicum*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Corynebacterium laevaniformans* (BATISTA, 2006).

Euzenat, Guilbert e Combes (1996) destacaram um bom rendimento, na produção de levana, pelo *B. subtilis*. A bactéria *B. subtilis* é um bacilo encontrado naturalmente no solo e é considerado um modelo de estudos, para bactérias gram-positivas, devido ao grande conhecimento das suas características genéticas e fisiológicas. Apresenta ainda as vantagens de não apresentar patogenicidade, não colonizar tecidos e possui boa capacidade de formação de esporos (HARWOOD, 1992). O *B. subtilis* tem sido aplicado em diversas abordagens na indústria farmacêutica como a produção de antígenos de interesse na fabricação de vacinas (PACCEZ, 2007).

### 3.1.1 Produção de Levana

A quantidade de EPS, produzido pelos microrganismos, está intimamente relacionada com as condições específicas de crescimento celular e com a composição do meio de cultura. Singh e Fett (1995) afirmaram que o aumento da osmolaridade e a desidratação são importantes fatores na produção de EPS; em especial o alginato e a levana. A adição de NaCl e etanol, visando o aumento da osmolaridade e desidratação no meio de cultura, aumentaram a capacidade de produção de levana na *Pseudomonas pv. phaseolicola*. Fungos também podem produzir EPS, embora em quantidades muito menores (WU, MAU e LIANG, 2008).

Alguns fatores podem prejudicar negativamente a produção de EPS como a presença de açúcares redutores e contaminações. A presença de glucose e frutose, no meio de cultivo, podem reduzir a obtenção de EPS na faixa de 50-80% (ANANTHALAKSHMY e GUNASEKARAN, 1999). As corretas técnicas de manipulação microbiana também devem ser observadas para se obter melhores rendimentos de EPS. A falta de técnicas apropriadas de manipulação microbiana podem promover a produção de metabólitos indesejáveis; bem como o crescimento de microrganismos contaminantes que são capazes de degradar o EPS produzido. Microrganismos contaminantes, como o *Arthrobacter ureafaciens*, podem degradar a

levana através da expressão de frutotransferases; reduzindo o rendimento da levana (TANAKA, 1989).

A produção enzimática da levana foi inicialmente descrita por Hestrin, Shapiro e Aschner (1943) em cepas de *B. subtilis*, *B. polymyxa* N.C.T.C 4744 e *Aerobacter levanicum* (característica de Jerusalém). A produção de levana foi analisada após precipitação do EPS com etanol a 72% seguida de hidrólise ácida; a estimativa da frutose foi realizada colorimetricamente. As três espécies estudadas produziram levana a partir de sacarose e rafinose. A levanasacarase, produzida pelo *B. subtilis*, foi produzida de modo adaptativo (exocelular) a um meio saturado com o açúcar. Os outros microrganismos estudados apresentaram esta enzima de modo constitutivo. A produção de levana foi realizada em meio com 10% de sacarose por 4 dias a 30°C; atingindo a concentração de 12,5%.

Em 1945, Avineri e Hestrin avaliaram a produção de diferentes polissacarídeos a partir da sacarose; por *Aerobacter levanicum*. O principal objetivo deste trabalho foi estudar as variáveis que foram mais significativas para se obter um bom rendimento de levana. O primeiro parâmetro estudado foi o pH aonde constatou-se uma curva de pH-atividade regular e simétrica, na faixa de 5,0-5,8, para a levanasacarase. Nesta mesma faixa de máxima atividade enzimática da levanasacarase, obtiveram-se também máximo rendimento de levana; em torno de 250 mg/100 mL/5 h. O pH ideal, para a produção do EPS, deve ser aquele que permite o melhor crescimento do microrganismo e melhor atividade da enzima envolvida (PRASERTSAN et al., 2008).

A concentração de sacarose também influenciou no rendimento da levana. Verificou-se que a atividade enzimática da levanasacarase cresce exponencialmente até 3 % de sacarose. A partir de 3%, a atividade enzimática entraria numa fase estacionária atingindo o rendimento máximo de 300 mg/100mL. A concentração enzimática também apresentou efeito na atividade específica da levanasacarase. A partir de 0,5 mL da enzima, em 3 mL da mistura reacional, a obtenção da levana passou a ser constante em 300 mg/100mL. Tal fato ocorreu pela perda da especificidade enzimática.

Em 1955, Mattoon et al. estudaram a síntese de levana bacteriana de massa molar intermediária (25.000 a 200.000 Da), para aplicação como extensores plasmáticos. Inicialmente, realizou-se uma seleção dentre 850 espécies de culturas isoladas. Sete apresentaram as condições ideais para serem usados



para aumentar o volume plasmático. O *B. subtilis* foi um grande candidato, dentre as sete espécies selecionadas. Verificou-se então algumas condições que influenciaram no rendimento da levana. A porcentagem do inóculo foi um parâmetro importante para se obter melhores rendimentos de levana. A quantidade de inóculo ideal foi de 2% com 24 h de fermentação a 30°C. Obtiveram quantidades em torno de 8,4 mg/mL de levana.

A temperatura também demonstra ser um parâmetro importante para se obter maior rendimento de levana. O comportamento da fermentação diferenciou consideravelmente quando a temperatura de incubação foi variada em apenas 5°C. Foram testadas duas temperaturas para a incubação: 25 e 30°C. Os dados indicaram que a produção de levana, à temperaturas baixas, é muito mais favorável para o *B. subtilis*; 9,3 mg/mL à 25°C/ 24 h e 6,8 mg/mL à 30°C/24 h. O pH também influenciou na obtenção da levana; a melhor faixa da ação enzimática estava entre 5,3-5,5, obtendo-se aproximadamente até 27 mg/mL.

Em 1983, Park, Mortatti e Sato estudaram a produção da levana, a partir de sacarose, utilizando a *Zymomonas mobilis*. Observaram que a variação de apenas 5°C na temperatura de incubação foi o suficiente para reduzir significativamente a produção de levana; podendo afirmar que a levanasacarase apresenta uma expressão termo-responsiva (LI et al., 2006).

As condições de produção podem influenciar na solubilidade da levana; parâmetro observado no processo produtivo e aplicação industrial. *Bacillus licheniformis* podem produzir uma levana, insolúvel em água, com potencial aplicação na recuperação de óleo. Este EPS auxilia na obstrução dos poros do solo, durante o processo de recuperação do óleo. A insolubilidade é essencial para que o fluxo de água, presente no solo, não remova o EPS. Os parâmetros observados para a produção da levana, insolúvel em água, foram em temperaturas menores que 55°C, pH entre 6 e 9, pressão menor que 500 atm e concentração de sais a 4% (RAMSAY, COOPER e NEUFIELD, 1989; GHALY et al., 2007).

Em 1991, Takahama, Kuze e Okano caracterizaram a levanasacarase do *Bacillus natto*. A condição otimizada enzimática observada foi no pH 6,2 a 35°C, na produção de lactosacarase. A enzima permaneceu estável na faixa de pH 5,5-7,0 até 35°C.

Em 1992, Han e Watson verificaram diferentes fontes de carbono na produção da levana microbiana. Os autores utilizaram a sacarose, caldo de cana e

melaço de beterraba; utilizando o *Bacillus polymyxa*. O microrganismo converteu aproximadamente 46% da frutose, no meio contendo sacarose, em levana. Entretanto, o rendimento da levana foi muito menor nos meios que continham caldo de cana e melaço de beterraba.

Em 1996, Euzenat, Guilbert e Combes estudaram a produção de fruto-oligossacarídeos, pela levanasacarase obtida de *B. subtilis*. Duas variáveis foram avaliadas quanto à produção de levana; a temperatura e a concentração de sacarose. Foram testadas duas temperaturas, 37°C e 60°C e as seguintes concentrações de sacarose, 1; 1,3; 1,8; 2,25 e 2,6 molar. Os melhores rendimentos da produção de levana (31,7%) foram obtidos nos valores 1,8 molar de sacarose, a 37°C, com 9,5 h de fermentação. As análises de HPLC também demonstraram que a levanasacarase produziu simultaneamente tanto a levana quanto fruto-oligossacarídeos (GP<50).

Choi, Sung e Choi (2001) verificaram a produção de uma substância viscosa numa comida típica coreana, o chungkookjang ou soja fermentada; também conhecida como Natto no Japão. Através de estudos de filogenia descobriu-se que o produtor dessa substância era o *Bacillus subtilis* BS62. Extratos da soja fermentada foram precipitados com etanol, hidrolisadas com HCl 0,1 N ou invertase; em seguida o hidrolisado foi analisado em cromatografia de camada delgada e troca-iônica. Verificou-se que esta substância viscosa se tratava da levana. Os extratos da soja fermentada foram obtidos fermentando-se a soja a 37°C com um dia de cultivo.

Shih et al. (2005) estudaram a produção e caracterização de levana, produzida pelo *B. subtilis*, isolada do Natto. Foram utilizados 20% (p/p) de sacarose com 21 h de fermentação. O rendimento da levana foi entre 40-50 mg/mL. O produto consistiu em duas frações com diferentes massas molares (1794 e 11 KDa); a quantidade da levana de maior massa molar declinava com o aumento do tempo de fermentação. Porém ambas as levanas, de maior e menor massa molar, eram produzidas simultaneamente.

Recentemente tem-se usado o planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta para a otimização da produção de metabólitos de interesse. Um planejamento fatorial permite avaliar as contribuições de múltiplos fatores em uma ou mais respostas. Pode-se realizar um delineamento fatorial completo ou fracionado com vários fatores em diferentes níveis. A superfície de resposta modela os fatores com a resposta obtida; o objetivo é otimizar esta

resposta. Rahulan et al. (2009) otimizaram a produção de uma peptidase de *Streptomyces gedanensis* modulando os fatores concentração do substrato, NaCl e pH inicial.

Oliveira et al. (2007) realizaram um planejamento fatorial para a produção de levana, a partir de *Zymomonas mobilis*, utilizando fontes de baixo custo e regionais de carboidratos. Os autores utilizaram a sacarose comercial, caldo e melaço de cana de açúcar como fontes de carbono. Os resultados indicaram a obtenção de 21,7; 15,5 e 2,6 g/L de levana para a sacarose comercial, melaço e caldo de cana de açúcar respectivamente. O crescimento da biomassa, no caldo de cana de açúcar, foi 2,76 vezes maior em sacarose; justificando sua escolha mesmo com o rendimento menor. Segundo os autores, a avaliação de certas variáveis, numa resposta independente, torna-se necessária para não ocorrer uma suplementação desnecessária dos meios de culturas; minimizando custos.

Melo et al. (2007) otimizaram a produção de levana por um planejamento fatorial  $2^{4-1}$  variando as condições de fermentação. Todos os fatores testados; concentração de sacarose, temperatura e agitação, influenciaram a produção de levana.

Borsari et al. (2006) estudaram a influencia das fontes de carbono na produção de levana por *Zymomonas mobilis*. Os autores utilizaram um modelo fatorial  $2^3$  com um total de 8 experimentos. Os fatores estudados foram o processo de fermentação, concentração de caldo de cana de açúcar e de sacarose em g/L; as suas interações também foram consideradas. Os resultados demonstraram que o fator caldo de cana teve um efeito positivo nas variáveis respostas. A melhor produção foi de 40,14 g/L em 150 g/L de sacarose em fermentação batelada.

### 3.1.2 Aplicação dos Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos, produzidos por microrganismos, apresentam ampla aplicabilidade em diferentes setores da economia. Estes polissacarídeos bacterianos e fúngicos tornam-se vantajosos para o emprego industrial; pois apresentam propriedades semelhantes às do agar e características reológicas que os tornam desejáveis na indústria. Grande aplicação pode ser observada na

indústria alimentícia; contribuem principalmente no aumento da textura, viscosidade e elasticidade dos alimentos (DUBOC e MOLLET, 2001).

Viñarta et al. (2006) determinaram a capacidade dos exopolissacarídeos, produzidos pelo *Sclerotium rolfsii*, na redução da sinerese experimentada por massas cozidas durante o processo de refrigeração. Houve completa inibição ou redução de 91% da sinerese com o uso dos EPS. Tais habilidades permitem que o produto alimentício seja conservado por mais tempo sem comprometimento das suas propriedades funcionais e sensoriais. Esses autores ainda avaliaram a viscosidade oferecida pelos EPS a diversos solventes. Houve um aumento da viscosidade em solventes como a água, leite integral e desnatado; além da caracterização de um comportamento pseudoplástico. Estas propriedades podem ser interessantes na melhora sensorial dos alimentos.

A indústria oleífera também se beneficia do uso de EPS. Shah e Ashtaputre, 1999, avaliaram as propriedades reológicas dos EPS, produzidos pelo *Sphingomonas paucimobilis* GS1, na exploração de óleo. Verificaram que os EPS podem melhorar as propriedades do fluxo do fluido, utilizado na perfuração, durante o processo de extração do óleo. Os exopolissacarídeos aumentaram a habilidade de suspensão do sedimento, perfuração e tixotropia do fluido de perfuração. Tais propriedades permitem que a exploração de óleo seja mais eficiente. O processo de recuperação do óleo também pode ser aumentado com a aplicação de EPS. *Bacillus licheniformis* podem produzir uma levana, insolúvel em água, com potencial aplicação na recuperação de óleo. Este EPS auxilia na obstrução dos poros do solo durante o processo de recuperação do óleo. A insolubilidade é essencial para que o fluxo de água, presente no solo, não remova o EPS (RAMSAY, COOPER e NEUFIELD, 1989; GHALY et al., 2007).

Exopolissacarídeos microbianos podem, ainda, ser aplicados em técnicas de imobilização enzimática. Cavalcante, Carvalho e Cunha (2006) imobilizaram covalentemente a tripsina sobre uma membrana produzida pela *Zoogloea sp.*, em melaço de cana. Os resultados fornecidos pelos filmes de EPS, obtidos da *Zoogloea sp.*, na imobilização da tripsina foram satisfatórios. As enzimas apresentaram maior estabilidade térmica quando comparada com a enzima nativa e não demonstraram diminuição da atividade após sete ciclos de reutilização.

O uso destes filmes, obtidos a partir de EPS, vão além da sua aplicação na enzimologia. Estas películas podem ser incorporadas em camadas

protetoras e em embalagens de alimentos devido à sua potencialidade em aumentar a vida de prateleira de alimentos. Um prazo de validade maior significa maiores chances de lucro para as indústrias. Nesta perspectiva, pesquisadores aplicaram o EPS Kefirana na fabricação de biofilmes e avaliaram as variáveis que influenciam nas características reológicas dos filmes (PIERMARIA et al., 2008).

A preocupação ambiental tem crescido enormemente, na última década, com o objetivo do desenvolvimento sustentável. Para tal, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas eficientes de descontaminação. Destaca-se a biorremediação que consiste na utilização de seres vivos, ou seus componentes, na recuperação de áreas contaminadas (KALOGERAKIS, PSILLAKIS e ALVAREZ, 2005; JÖRDENING e WINTER, 2005). Shah et al. (2000) produziram e caracterizaram um exopolissacarídeo produzido por uma cianobactéria marinha, a *Cyanothece sp.*. Concluiu-se que o fenômeno de gelificação, produzido pelo EPS, tem potencial aplicação na remoção de metais de soluções. Mais de 90% do níquel, cobre e cobalto puderam ser removidos de soluções contendo respectivamente 22,5; 17,5 e 5,0 mg destes metais. Os exopolissacarídeos, produzidos pela *Cyanothece sp.*, constituem então uma alternativa para descontaminação de soluções contendo estes metais.

Yim et al. (2007) caracterizaram o modelo de biofloculação do EPS p-KG03 da *Gyrodinium impudicum*. Floculantes microbianos são uma alternativa para a solução de problemas ambientais pois promovem a agregação de partículas e células em sua malha polimérica e neutralizam a carga das suas moléculas. Podem se beneficiar, para o tratamento de resíduos, indústrias do campo químico, alimentício, processamento de minerais, bem como o tratamento da água. O EPS p-KG03 apresentou, como agente biofloculante, mais de 90% de atividade floculante em suspensões de Kaolin 0,5 mg/L – 1,0 mg/L; mesmo em baixas concentrações. Além de apresentar estabilidade química em pH ácido (3,0-6,0), ampla faixa de temperatura (4-90°C) e na presença de agentes catiônicos.

A levana apresenta ampla aplicação industrial e tecnológica. Grande destaque para indústria alimentícia; aonde é utilizada como estabilizante, fixador de sabores, cores e espessante para vários alimentos, inclusive pode ser usado na elaboração de produtos dietéticos por ser um polímero de frutana (HARRINGTON e HEYL, 1999).

A aplicação clínica da levana remonta desde a década de 50. Mattoon et al. (1955) realizaram a síntese bacteriana de levana de massa molar intermediária, para aplicação como extensores plasmáticos. Sete cepas apresentaram polissacarídeos com taxas adequadas de pressão osmótica e quociente de viscosidade para aumentar o volume plasmático. A aplicação clínica tem sido cogitada diante das características funcionais no organismo humano. Pode ser aplicado como agente anticarcinogênico e hipocolesterolemizante; auxiliando assim tratamentos terapêuticos convencionais (OLIVEIRA et al., 2007).

Calazans et al. (2000) relacionaram a atividade antitumoral da levana com a massa molar do EPS. Ocorreu uma faixa de massa molar com máxima atividade contra o tumor. Nenhuma explicação satisfatória foi encontrada para relacionar a massa molar com a atividade antitumoral.

Maciel, 2008, realizou a síntese e caracterização de partículas de levana-magnetita. Neste estudo, a levana foi utilizada como revestimento de partículas de magnetita e caracterizada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), magnetometria, difração de raios-X (DRX) e espectroscopia na região do infravermelho (IV). Partículas magnéticas como a magnetita, revestida com polissacarídeos, estão sendo usadas em número crescente de aplicações médicas (meios de contraste, para imagem de ressonância magnética ou o tratamento de câncer). O revestimento da magnetita, com polímeros, confere estabilidade às partículas magnéticas; principalmente em meio fisiológico.

EPS têm se destacado também em aplicações em dispositivos de liberação modificada de fármacos, na indústria farmacêutica. Estes polímeros naturais são preferidos, em detrimento de polímeros sintéticos, devido ao baixo custo, alta disponibilidade e ausência de toxicidade (BRESOLIN et al., 2003). Os polímeros microbianos apresentam propriedades desejáveis para a indústria farmacêutica. Podem atingir altas produções em condições adequadas, obter EPS específicos através de técnicas genéticas, produção pode ser controlada e não dependem de condições climáticas, etc. Dentre os polissacarídeos microbianos, a gelana, xantana e escleroglucana têm sido empregadas com resultados promissores no controle da liberação de fármacos.

A gelana é um polímero aniônico, secretado por *Pseudomonas elodea*, comercialmente disponível (Gelrite® e Kelcogel®) (BRESOLIN et al., 2003). Kumar, Satish e Shivakumar (2008) elaboraram um implante para a liberação do fármaco

metotrexato baseado na gelatina. Este medicamento é um antagonista do ácido fólico interferindo na síntese de DNA; é usado para tratamentos de câncer e doenças auto-imunes. O implante era formado de múltiplas camadas de álcool polivinílico, quitosana e gelatina. Os resultados in vivo demonstraram que o metotrexato foi liberado vagarosamente por um período de trinta dias, bem como não houve a formação de cápsula fibrosa ao redor do implante.

A xantana é um exopolissacarídeo produzido por fermentação da bactéria *Xanthomana campestris*. Sua estrutura primária é composta de uma cadeia principal de unidades de glucose unidas por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6). Pode ocorrer a formação, em unidades alternadas, de uma cadeia lateral composta de um trissacarídeo formado por unidades de  $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-ácido glucurônico e  $\alpha$ -D-ácido manurônico (BRESOLIN et al., 2003). Sankalia, Sankalia e Mashru (2008) estudaram a liberação modificada da glipizida, através de uma matriz de comprimido constituída do EPS xantana. A glipizida é um hipoglicemiante oral utilizado para pacientes que possuem diabetes. Os resultados sugeriram que a matriz do comprimido, constituída de xantana, promoveu uma liberação in vitro sustentada e constante da glipizida por 12 h.

A escleroglucana é um polissacarídeo exocelular secretado pelo *Sclerotium rolfsii* e apresenta uma cadeia principal formada por unidades de glucose, unidas por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) (BRESOLIN et al., 2003). Casadei et al., em 2007, sintetizaram e caracterizaram um gel derivado da escleroglucana. Este gel objetivava a liberação modificada do Aciclovir. O aciclovir é um agente antiviral altamente ativo in vitro contra o vírus Herpes simplex (VHS), tipos 1 e 2, e o vírus Varicela zoster (VVZ). Os resultados sugeriram que este gel poderá ser usado para formulações de uso tópico e implantes in situ.

### 3.2 LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

A liberação modificada de fármacos é a área do conhecimento que estuda dispositivos que possuem uma liberação sustentada e/ou uma liberação controlada do fármaco. O objetivo da liberação sustentada é manter a concentração plasmática do fármaco à níveis constantes, bem como por tempos prolongados. A

liberação do fármaco, nestes sistemas de liberação sustentada, pode demorar dias até anos (JANTZEN e ROBINSON, 1996).

Nesta perspectiva, Ughini et al. (2004) desenvolveram e avaliaram uma matriz de liberação sustentada composta de xantana e galactomanana substituída; originárias respectivamente do *Xanthomonas campestris* e *Mimosa scabrella*. O fármaco utilizado para a avaliação da liberação sustentada foi o diclofenaco de sódio. O sistema matricial hidrofílico formado foi testado em comprimidos e cápsulas; contendo 50 e 100 mg de diclofenaco de sódio com os seguintes valores de pH, 1,4; 4,0; 6,8. Os autores encontraram valores interessantes para este sistema matricial à base de EPS; 78,6% e 35,1% do fármaco foram liberadas depois de 24h para comprimidos e cápsulas respectivamente. Os autores concluíram ainda que o mecanismo de erosão exercesse um papel determinante para liberação do fármaco, bem como a influência da quantidade de biopolímeros nestas formulações. A quantidade do fármaco e o pH também foram variáveis importantes; os meios ácidos promoveram uma cristalização intramolecular do diclofenaco de sódio, prejudicando sua expulsão do dispositivo de liberação modificada.

A liberação controlada objetiva definir a concentração do fármaco num tecido específico; ou seja, a liberação é sítio-específica (JANTZEN e ROBINSON, 1996). Liberações sítio-específicas oferecem ao paciente um melhor gerenciamento na liberação do fármaco com redução da dose, menos efeitos adversos ao medicamento (RAM), melhores respostas terapêuticas, maior flexibilidade posológica e melhor estabilidade química (OLIVEIRA, 2006). Colinet et al. (2007) desenvolveram e avaliaram a estabilidade de géis pH-dependente formados de escleroglucana e borato; para liberação controlada. A escleroglucana é um exopolissacarídeo produzido principalmente por microrganismos do gênero *Sclerotium*. A estabilidade do gel foi verificada em função do pH, concentração do EPS e borato. Os autores encontraram que o gel apenas se dissolvia em meios alcalinos; dada à conformação que a escleroglucana adquiria nesta faixa de pH. Ainda segundo os autores, a erosão, um importante mecanismo na liberação controlada, foi facilmente modulada através da densidade da rede polimérica e pH.

Há uma ampla variedade de sistemas de liberação modificada de fármacos utilizados na indústria farmacêutica. Nestes sistemas incluem-se os lipossomas, nano e micropartículas, microesferas biodegradáveis, bombas



osmóticas, filmes cólon-específicos, sistemas transdérmicos, pró-fármacos, sistemas poliméricos matriciais, entre outros (DELUCIA, 2007).

Pitarresi et al. (2007) prepararam e caracterizaram um modelo de hidrogel com dextrana, proveniente de *Leuconostoc spp.*, e derivados de poliaspartamida para a liberação cólon-específica de fármacos. Dextranas são polímeros de glucose unidas por ligação glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) e que podem ser degradadas por dextranases produzidas pela microbiota do cólon. Para reticulação destes polímeros e conseguinte formação do hidrogel; foi preparada uma solução aquosa que foi exposta a uma irradiação com o comprimento de onda de 313 nm. A reticulação foi confirmada por análises de espectroscopia no infravermelho. Os autores utilizaram o dipropionato de beclometasona, usado no tratamento de doenças inflamatórias do cólon, para estudar o perfil de liberação do sistema; a droga foi liberada por até 24 h, bem como apresentou-se sítio-específica.

Coviello et al. (2005) desenvolveram e caracterizaram uma matriz gélica contendo escleroglucana carboxilada e cálcio, para liberação de fármacos. A escleroglucana modificada foi capaz de formar gel na presença do íon, pois o cálcio agiu como agente reticulante entre os grupos carregados negativamente (grupos carboxilas) presentes nas cadeias vicinais; formando zonas de junção. Foram utilizadas duas substâncias modelo para a determinação do perfil de liberação; a teofilina e mioglobina. A teofilina é um potente broncodilatador amplamente utilizado em doenças pulmonares; a mioglobina é uma proteína globular transportadora de oxigênio. Os autores, através do uso dessas substâncias modelo, determinaram que a modulação da liberação está intimamente relacionada com as dimensões moleculares.

Ringe e Randuz (2006) estudaram as nanopartículas, contendo dextrana, para liberação modificada de fármacos. O autores objetivaram criar um sistema de distribuição para o tratamento da transfecção celular; processo na qual células eucarióticas são infectadas por DNA ou RNA viral. As nanopartículas foram obtidas por um processo de microemulsão óleo/água. As microemulsões são sistemas constituídos por dois líquidos imiscíveis, um disperso formando a fase contínua e o outro na forma de microgotículas. Os autores obtiveram maior estabilidade do sistema, contendo dextrana, para o acondicionamento da daunorubicina; um quimioterápico utilizado na redução de tumores.

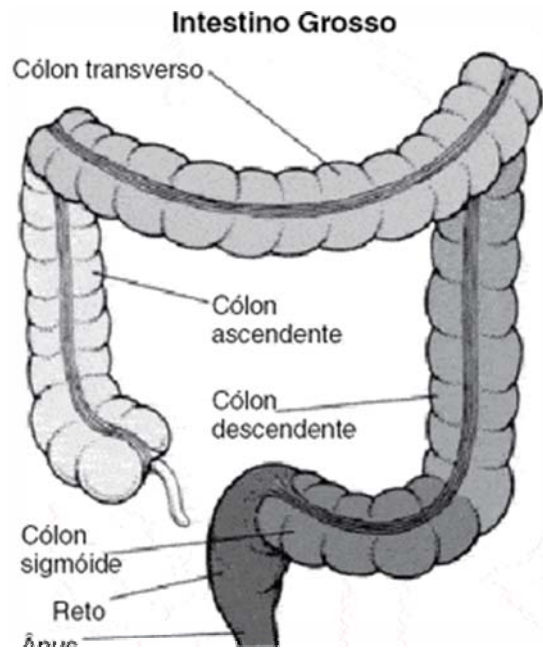
Dentre os dispositivos de liberação usados na atualidade, tem se destacado o uso de filmes cólon-específicos (WEI et al., 2008). Estes filmes de liberação cólon-específica apresentam em sua composição um polímero pH - dependente ou tempo dependente aditivado com algum substrato que é biodegradado especificamente pela microflora colônica. A garantia que o substrato será atacado, apenas na região colônica, é que este é constituído de uma microflora única e complexa, abrigando mais de 500 espécies bacterianas, com crescimento ostensivo de microrganismos anaeróbicos (QUINTANILHA et al., 2007).

Mundargi et al. (2007) desenvolveram um sistema cólon-específico para o tratamento da amebíase; uma doença que pode afetar o intestino, causada pela *Entamoeba histolytica*. Os autores utilizaram o Eudragit-L 100 e diversos substratos, com destaque a goma xantana; um heteropolissacarídeo obtido por fermentação aeróbica do *Xanthomonas campestris*. O fármaco estudado neste estudo foi o metronidazol; principal terapia em casos de amebíase. Os autores encontram que o perfil de liberação estava relacionado com a natureza e concentração dos biopolímeros usados nas formulações. O dispositivo composto de xantana, revestido com o copolímero goma guar-ácido metacrilato, mostrou uma liberação do fármaco em torno de 30-40% durante as primeiras 4-5 h; o revestimento entérico possibilitou uma diminuição de 18-24% no perfil de liberação.

Alguns biopolímeros podem trazer vantagens para os filmes. Tong, Xiao e Lim (2008) estudaram as propriedades de filmes contendo pululano, alginato e carboximetilcelulose. O pululano é um homopolissacarídeo exocelular produzido pelo microrganismo *Aureobasidium pullulans*. Os resultados sugerem que os filmes contendo pululana foram mais fortes do que os filmes constituídos apenas de alginato e carboximetilcelulose, principalmente na força tensil e quebra por alongação. A permeabilidade ao vapor de água foi baixa para o filme puro de pululano ( $4,4 \cdot 10^{-7}$  g m/ Pa h m<sup>2</sup>) quando comparado à blenda polimérica contendo plastificante glicerol ( $4,2 \cdot 10^{-6}$  g m/ Pa h m<sup>2</sup>).

As condições idéias, inerentes à fisiologia do ambiente colônico, que o tornam uma região propícia à liberação de fármacos são: pH próximo do neutro, tempo lento de trânsito intestinal, baixa atividade enzimática proteolítica; bem como a presença de substratos anabólicos ao metabolismo bacteriano, que fazem com que o ambiente colônico seja amplamente diversificado, único e complexo, abrigando mais de 500 tipos de espécies bacterianas, com crescimento ostensivo de

microrganismos anaeróbicos (TUOHY et al., 2003; MANNING e GIBSON, 2004; QUINTANILHA, 2007). O ambiente colônico está situado no intestino grosso e é responsável pela absorção de água e eletrólitos das fezes (MOORE e DALLEY et al., 2001).



**Figura 5** – Diagrama representativo do cólon (MERCK, 1996)

Considerando as características fisiológicas do ambiente colônico, Singh, Trombetta e Kim (2004) investigaram um dispositivo à base de gelana, para liberação sítio-específica da Azatioprina. A gelana consiste em unidades repetidas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glucose,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) – D – ácido glucurônico,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) ramnose com resíduos de acetato, acetil e glicerato ligados a resíduos de glucose adjacentes ao ácido glucurônico. É produzida pelo *Sphingomonas paucimobilis* e é cólon - específica, pois é susceptível às galactomanases produzidas pelas bactérias do ambiente colônico. O sistema era constituído de um polímero pH-dependente (Eudragit (R) S-100) e a gelana; substrato susceptível ao ataque enzimático da microflora colônica. Os dispositivos foram caracterizados quanto à morfologia, através da microscopia eletrônica de varredura, e comportamento ante a um fluido de simulação colônica (FSC); na presença e ausência das galactomanases.

Neste estudo, os autores constaram que, num período de 2 h de liberação, houve 10% maior quantidade da droga no meio FSC contendo galactomanases; mostrando a contribuição da gelana para a cólon especificidade do sistema. A Azatioprina tem suas propriedades antileucêmicas e antiinflamatórias melhoradas quando liberadas no ambiente colônico.

Outra diferença significativa que faz do cólon uma região ideal para a liberação de fármacos, está no sistema venoso. A drenagem da região distal do TGI é realizada predominantemente pelo sistema linfático, enquanto, na região proximal, é feito pela veia porta – hepática e sistema linfático. Sendo assim, fármacos lipofílicos introduzidos na região distal do TGI, sofrerão menos biotransformação hepática (efeito de primeira passagem) e melhorarão sua biodisponibilidade em caso de algum tratamento sistêmico (GERSHKOVICH et al., 2007).

Biotransformação ou metabolismo de fármacos, segundo conceito moderno, é toda alteração química que os fármacos sofrem no organismo, geralmente por processos enzimáticos. O principal local de biotransformação, sem dúvida, é o fígado; um órgão que encerra numerosas enzimas. Durante a biotransformação, de regra, aparecem metabólitos mais polares e mais hidrossolúveis, os quais são facilmente excretados pelos rins. Assim, fisiologicamente, pode-se dizer que a biotransformação é um mecanismo de defesa do organismo que acelera a eliminação de substâncias estranhas. Quando se pode diminuir o processo de biotransformação de um determinado fármaco, pode-se aumentar o seu efeito terapêutico. O cólon, pelas características fisiológicas da sua drenagem venosa, é ideal para diminuir o processo de biotransformação e assim minimizar a inativação do fármaco pelo organismo (DELUCIA, PLANETA e FILHO 2004).

A microflora colônica é constituída principalmente pelas bifidobactérias e lactobacilos. São responsáveis principalmente pela proteção do cólon, pois impedem a proliferação de bactérias consideradas patogênicas, dentre elas: *Salmonella*, *Clostridium* e algumas cepas de *Eubactérias*. A microflora colônica apresenta um papel essencial para que um filme seja denominado cólon-específico; pois estas bactérias são produtoras de enzimas redutoras e hidrolíticas que participam do processo de degradação fermentativa de algum componente presente no filme.

Dentre as substâncias que são susceptíveis às enzimas reductoras e hidrolíticas, da microflora colônica, estão os inúmeros grupos de nutrientes como o amido resistente, alguns oligossacarídeos e polissacarídeos não-amiláceos (JAIN, GUPTA e JAIN, 2007; VARDAKOU et al., 2007). Nesta degradação fermentativa enzimática são produzidos grandes quantidades de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Estes AGCC podem ser absorvidos pelo epitélio do cólon e serem usados como fonte de energia (MANNING e GIBSON, 2004; OUWEHAND et al., 2005). Outros benefícios, dos AGCC, estão o controle do trânsito intestinal (volume e frequência), aumento da biodisponibilidade de minerais, controle da motilidade da mucosa, aumento da proliferação celular epitelial, modulação das funções endócrinas e imunes (ROBERFROID et al., 2002).

Basan, Gümüsderelioglu e Orbey (2007) avaliaram as características de liberação de um hidrogel à base de dextrana; sensível à degradação fermentativa colônica. O fármaco utilizado foi a calcitonina; hormônio polipeptídico composto de 32 aminoácidos. Os autores encontraram que o sistema foi conveniente para liberação cólon-específica da calcitonina, pois a dextrana apresentou biodegradabilidade no ambiente colônico. O agente reticulante utilizado foi o epíclorohidrina; formando o complexo dextrana-epíclorohidrina. A reticulação foi estudada em diferentes temperaturas, bem como na presença ou não de etanol. As melhores condições para a reticulação foram encontradas a 10°C na presença de etanol; pois a epíclorohidrina foi melhor dissolvida em etanol. As propriedades de hidratação foram de grande importância para embebedar o hidrogel com uma solução aquosa de calcitonina.

Algumas patologias e respectivos tratamentos farmacológicos, que podem se beneficiar pelo uso de filmes para liberação modificada de fármacos, estão apresentados na Tabela 1. Dentre estas patologias citam-se: síndrome do intestino irritável (SII), câncer colo-retal, doença de Crohn e colite ulcerativa (FRIEND, 2005).

Estas várias afecções podem comprometer o cólon com quadros de inflamações crônicas (edemas, fístulas e formação de úlceras). São acompanhadas muitas vezes de cólicas abdominais recorrentes e diarréias. A SII é uma perturbação da motilidade de todo o trato gastrintestinal que provoca dor abdominal, prisão de ventre e diarréia. Esta doença tem três vezes mais incidência em mulheres do que homens. O trato intestinal fica sensível a muitos estímulos (estresse,

alimentação, fármacos, hormônios, etc). A doença de Crohn é uma inflamação crônica da parede intestinal. Nas últimas décadas, a incidência desta doença aumentou tanto nos países ocidentais como nos orientais. As causas da doença centram-se em três possibilidades: disfunção do sistema imunitário, infecção ou dieta alimentar. A colite ulcerativa é uma doença crônica em que o intestino se inflama e forma úlceras. Provocam diarreias com sangue, cólicas e febre. As complicações incluem hemorragia maciça, perfuração intestinal e infecção generalizada (MERCK, 1996). As formulações farmacêuticas disponíveis atualmente, para tratamento destas doenças são: formulações orais de liberação lenta ou enemas de uso retal (Tabela 1). Estes tratamentos tradicionais não são normalmente sítio – específicos e tem alta frequência de efeitos colaterais (JAIN, GUPTA e JAIN, 2007).

**Tabela 5** – Principais doenças colônicas, sintomas e tratamento farmacológico utilizado (JAIN, GUPTA e JAIN, 2006).

| <b>Doenças</b>                        | <b>Sintomas</b>   | <b>Fármacos e agentes ativos</b>   |
|---------------------------------------|---|--|
| Doença de Crohn                       | Diarréia, dor e distensão abdominal, úlcera, fezes sanguinolentas, perda de apetite e peso  | Hidrocortisona, Budenosida, Prednisolona, Sulfasalazina, Olsalazina, Mesalazina, Balsalazida, Infiximab      |
| Colite Ulcerativa                     | Inflamação e hemorragia retal   | 5 – Ácido Amino Salicílico, Sulfasalazina, Balsalazida, Infiximab, Azatioprina, Mercaptopurina               |
| Síndrome do intestino irritável (SII) | Dor e distensão abdominal, constipação, diarréia, flatulência, sensação de inchaço – pessoas com SII podem apresentar períodos de alternância entre constipação e diarréia                      | Diciclomina, Hioscina, Propantelina, Cimetrópio, Mebeverina, Trimebutina, Escopolamina, Alosetron, Tegaserod |
| Câncer Colo - retal                   | Mudança nos hábitos intestinais, fezes estreitas ou sanguinolentas, hemorragia retal, inexplicável perda de peso, distensões e gases abdominais, dores abdominais acompanhadas de peristaltismo | 5 – Fluoruracil, Leucovorin, Oxaliplatino, Irinotecano, Bevacizumabe, Cetuximabe                             |
| Diverticulite                         | Formação do divertículo no cólon devido à infecção bacteriana   | Sulfametoxazol + Trimetoprima, Metronidazol  |
| Doença de Hirschsprung                | Formas severas de constipações – peristaltismo ocorrem em torno de 1 a 2 vezes por semana   | Metronidazol, Vancomicina, Loperamida, Toxina botulínica   |

Visando o tratamento da colite ulcerativa, Varshosaz et al. (2008) desenvolveram um dispositivo de liberação cólon específico. Os autores

desenvolveram um pró-fármaco à base de dextrana. Pró-fármacos são fármacos que se encontram na sua forma inativa quando administrados, porém são ativados quando sofrem alguma biotransformação *in vivo*. A budesonida, um potente glicocorticóide usado no tratamento da colite ulcerativa, foi conjugado com a dextrana; susceptível ao ataque hidrolítico pela microflora colônica. Os autores avaliaram que a dextrana foi altamente eficaz na promoção da cólon-especificidade promovida à budesonida; tais fármacos apresentam baixa eficiência quando administrados isoladamente. A massa molar do EPS contribuiu para o sucesso do sistema. Dentre as massas molares testados para a dextrana (10.000, 70.000, 500.000), a dextrana de massa 70.000 mostrou-se com melhores características de solubilidade e melhor perfil de liberação. Os conjugados foram estáveis nos tampões HCl 0,1N e tampão fosfato pH 6,8; a degradação se deu início em condições colônicas; tampão fosfato pH 7,4, 37°C com 6 h de incubação.

Os filmes são formados a partir de dispersões poliméricas aquosas. As partículas permanecem separadas no início da dispersão polimérica, no entanto, durante o processo de evaporação, as partículas dos constituintes sólidos das dispersões coalescem; formando o filme. Para o processo de evaporação, leva-se em conta a TMF (temperatura mínima para formação do filme polimérico) que é responsável pela coalescência individual e gradual dessas partículas.

Filmes moldados em temperaturas diferentes da TMF podem apresentar características indesejáveis (friabilidade, opacidade,...). A coalescência das partículas poliméricas é essencial para se obter filmes homogêneos. Os filmes podem ser obtidos por espalhamento sobre várias superfícies: teflon, vidro e folha de alumínio (LAMIN, 2006). Além da adição de substratos cólon-específicos, filmes poliméricos podem ser aditivados com plastificantes trazendo uma melhora na termodinâmica do material, assim como na diminuição da força tensil, aumento do alongamento, flexibilidade dos filmes e coalescência (SATTURWAR et al., 2003). A escolha do plastificante ideal é primordial para o desempenho eficiente do processo de revestimento. Sua escolha depende da capacidade de solvatar o polímero e alterar as interações de suas cadeias. Para otimização das características desejadas, pode-se alterar o tipo e a concentração dos plastificantes usados na fabricação do biofilme. O plastificante, quando não escolhido de forma adequada, pode diminuir a temperatura de degradação das amostras; diminuindo a estabilidade térmica do material formado (LAMIM, 2006).



Ensaio podem ser feitos, respaldados na literatura, para avaliação dos filmes cólon-específicos. Tem sido feito o índice de intumescimento (Ii), em diferentes meios de simulação das condições fisiológicas do trato gastrointestinal, juntamente com o ensaio de transmissão de vapor d'água (TVA). Estas metodologias são consideradas de baixo custo e de grande valor analítico (OLIVEIRA, 2006). Tais metodologias são empregadas eficientemente na caracterização de filmes aditivados com substratos susceptíveis à microflora colônica. Os resultados destes estudos podem verificar um aumento de potencial cólon-específico do filme aditivado (AKHGARI et al., 2006).

O intumescimento ou hidratação constitui característica imprescindível ao acesso e conseqüente favorecimento ao ataque do filme pela microflora colônica. Pode variar conforme densidade da reticulação, caráter iônico do polímero e osmolaridade (HUANG, YU e XIAO, 2007). O intumescimento ou hidratação dos filmes podem ser avaliados em diferentes meios do TGI. Filmes cólon-específicos devem possuir baixa hidratação em fluídos de simulação gástrica (FSG) e fluídos de simulação intestinal (FSI). Porém devem ter um aumento significativo da hidratação quando presentes em fluídos de simulação do cólon (FSC) (AKHGARI et al., 2006).

Hirsch et al. (1999) investigaram a degradação microbiológica de uma dextrana modificada, a laurildextrana, e de uma galactomanana reticulada para revestimento de substâncias destinadas à liberação cólon-específica. Os autores encontraram que o revestimento reticulado obteve um índice de intumescimento entre 309-520%, enquanto o revestimento, contendo apenas a laurildextrana com grau de substituição 0,12 e 0,40, apresentou um índice de intumescimento de 50-195%. Os autores encontraram ainda que a laurildextrana, com baixo índice de intumescimento, exibiu baixa taxa de dissolução do fármaco testado, bem como a degradabilidade cólon-específica. Os autores verificaram que a dissolução segue as leis de difusão que o sistema possui em ambientes aquosos; a solubilidade do fármaco é um fator também a ser considerado.

O ensaio TVA determina a permeabilidade do filme à água, avalia a efetiva mobilidade na matriz polimérica. Oferece um índice no qual é possível avaliar a mobilidade da membrana relacionando o espaço de volume livre com as moléculas de vapor de água (MONDAL e YONG, 2006). A TVA está intimamente relacionada com a hidroflicidade dos polímeros presentes no filme. Filmes aditivados com

polímeros, contendo altas proporções de grupos hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ), podem aumentar a TVA; estes polímeros polihidroxilados formam pontes de hidrogênio com a água. O uso de plastificantes pode influenciar o índice de TVA de um filme. Os plastificantes podem diminuir a TVA de uma película por originar estruturas mais compactas nas cadeias poliméricas, pois possibilitam a coalescência maior das partículas poliméricas. Filmes contendo alta resistência à transmissão de vapor d'água (TVA) são incapazes da liberação prematura de um fármaco revestido com uma película cólon-específica. Sendo assim, os valores do ensaio de TVA nos dão valores valiosos para inferir o comportamento do filme contra a umidade do ambiente fisiológico (AKHGARI et al., 2006).

Zenkiewicz e Richert (2008) aplicaram a metodologia de TVA para filmes nanocompósitos à base de polilactato. Polilactatos são biopolímeros obtidos da fermentação do ácido láctico, obtido por fermentação bacteriana da glicose. Os autores concluíram que a TVA está ligado à hidrofilicidade, estrutura e tamanho molecular dos biopolímeros.

Outras áreas do conhecimento aplicam exopolissacarídeos em filmes. O campo de tecidos modificados tem se desenvolvido rapidamente desde a década passada, e muitas pesquisas caminham para criar uma vasta variedade de tecidos vivos de substituição; trazendo novas alternativas de aplicação clínica. Estes tecidos são baseados na associação de polímeros sintéticos condutores e exopolissacarídeos. O compósito resultante apresentará a habilidade de estimulação elétrica, conferida pelo polímero sintético, com a atividade biológica, conferida pelo EPS. Dentre as atividades biológicas desejadas estão o aumento da angiogênese (desenvolvimento de vasos sanguíneos). Neste sentido, França (2007) estudou a produção de filmes automontados, constituídos por polianilina, aditivados com o exopolissacarídeo botriosferana; uma glucana caracterizada como  $(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-glucana}$  (BARBOSA et al., 2003). O autor obteve resultados satisfatórios na produção do filme; constatando uma boa associação do polímero ao exopolissacarídeo.

Filmes aditivados com exopolissacarídeos também são usados na indústria alimentícia; constituem uma alternativa para o acondicionamento de alimentos. Estes biomateriais contribuem para o aumento da vida de prateleira dos alimentos, bem como minimizam as conseqüências ambientais. Nesta perspectiva, Piermaria et al. (2009) desenvolveram e caracterizaram um filme baseado na

kefirana. A kefirana é uma glucogalactana obtida a partir da fermentação de grãos de kefir. A kefirana foi apta para formar filmes nas concentrações de 5 a 10 g/Kg. Os filmes foram caracterizados quanto as suas características reológicas, físico-químicas (umidade, atividade de água, espessura e transparência), caracterização da micro-estrutura (microscopia eletrônica de varredura e grau de cristalinidade), permeabilidade do vapor de água e propriedades mecânicas. Os filmes também apresentaram comportamento pseudoplástico.

Além de EPS, filmes têm sido aditivados com peptídeos denominados de pediocinas, provenientes do *Pediococcus sp.*; tais filmes podem apresentar atividade antimicrobiana e trazer assim melhores perspectivas no acondicionamento de frios (SANTIAGO-SILVA et al., 2009).

Considerando as citações de que a levana apresenta características físico-químicas para aplicação biotecnológica e a alta produção por microrganismos, aliado à sua aplicabilidade em filmes cólon-específicos para liberação modificada de fármacos, este trabalho produziu levana de *B. subtilis* NATTO para desenvolvimento de filmes cólon-específicos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Microrganismo

O microrganismo *Bacillus subtilis*, utilizado neste estudo, foi isolado do alimento japonês Natto pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina. Sua identificação foi realizada pelo Instituto André Tosello – Campinas, SP (ANEXO A).

#### 4.1.2 Meios de Cultura

##### 4.1.2.1 Meio de preservação (Ágar nutriente)

| <b>Constituinte</b> | <b>Concentração</b> |
|---------------------|---------------------|
| Peptona             | 5,0 g               |
| Extrato de carne    | 3,0 g               |
| Ágar                | 2,0 g               |
| Água destilada      | 1000 mL             |

## 4.1.2.2 Meio para obtenção do pré – inóculo (CALAZANS et al., 2000)

| <b>Constituinte</b>                             | <b>Concentração</b> |
|---|---------------------|
| Sacarose  | 100,0 g             |
| Extrato de levedura                             | 2,0 g               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 2,0 g               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1,0 g               |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,5 g               |
| Água destilada (qsp)                            | 1000 mL             |

## 4.1.2.3 Meio de fermentação (EUZENAT, GUILBERT e COMBES, 1996)

| <b>Constituinte</b>                             | <b>Concentração</b> |
|---|---------------------|
| Sacarose  | 400,0 g             |
| Extrato de levedura                             | 2,0 g               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 1,0 g               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 3,0 g               |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,06 g              |
| MnSO <sub>4</sub>                               | 0,02 g              |
| Água destilada (qsp)                            | 1000 mL             |

### 4.1.3 Ensaio de Citotoxicidade e Mutagenicidade

#### 4.1.3.1 Cultivo celular

Foram utilizadas, para os ensaios de mutagenicidade e citotoxicidade, células de ovário de Hamster chinês, CHO-K1, fornecidas pelo Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. As células foram cultivadas como monocamada em frascos de cultura de tecidos de 25 cm<sup>2</sup>.

#### 4.1.3.2 Meio de cultura

Foi utilizado, como meio de cultura das células CHO-K1, 1 pacote do F-12 Nutrient Mixture (DMEM) fabricado pela GibcoBRL®.

| <b>Constituinte</b>  | <b>Concentração</b> |
|--|---------------------|
| Meio de cultura  | 1 pacote            |
| NaHCO <sub>3</sub>   | 1,2 g               |
| Solução Antibiótica-antimicótica GibcoBRL® cat.: 15240-096 | 1 mL                |
| Água destilada q.s.p.                                      | 1000 mL             |

**Observações:**

Foi adicionado 10% de soro bovino fetal (GibcoBRL®) no meio de cultura das células CHO-K1.

4.1.3.3 Solução salina balanceada (PBS) livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ 

| <b>Constituinte</b>                    | <b>Concentração</b> |
|--|---------------------|
| KCl                                    | 0,2 g               |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$               | 0,2 g               |
| NaCl                                   | 8,0 g               |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$              | 1,15 g              |
| $\text{H}_2\text{O}$ deionizada q.s.p. | 1000 mL             |

O pH foi ajustado para 7,4.

4.1.3.4 Solução balanceada salina de Hanks sem  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ 

| <b>Constituinte</b>      | <b>Concentração</b> |
|--------------------------|---------------------|
| KCl                      | 0,4 g               |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 0,06 g              |
| NaCl                     | 8,0 g               |
| $\text{NaHCO}_3$         | 0,35 g              |

|  |          |
|--|----------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O           | 0,09 g   |
| D-Glucose anidra C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> | 1,0 g    |
| Fenol Vermelho   | 0,0012 g |
| H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.                             | 1000 mL  |

O pH foi ajustado para 7,4.

#### 4.1.3.5 Tripsina EDTA 0,025%

Adicionar à 1000 mL de Solução salina de Hanks:

| Constituinte   | Concentração |
|--|--------------|
| EDTA – Titriplex C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> .2 H <sub>2</sub> O | 0,1 g        |
| Tripsina (1:250) GibcoBRL car.: 27250-042  | 0,25 g       |

#### 4.1.3.6 Solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bomídico) (Sigma®) 3,33 g/mL

0,005 g de MTT foi solubilizado em 5 mL de PBS. A solução foi encaminhada para filtragem em papel filtro. Em seguida, foi adicionado meio de cultura sem soro bovino fetal.



## 4.1.3.7 Citocalasina 300µg/mL

| <b>Constituinte</b>                          | <b>Concentração</b> |
|--|---------------------|
| Citocalasina 2mg/mL (Sigma®, CAS:14930-96-2) | 300 µL              |
| PBS  | 1,7 mL              |

4.1.3.8 Solução Hipotônica de Citrato de Sódio  $3,4 \cdot 10^{-2}$  M

| <b>Constituinte</b>   | <b>Concentração</b> |
|---|---------------------|
| $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 10 g                |
| $\text{H}_2\text{O}$ deionizada q.s.p.                                | 1000 mL             |

## 4.1.3.9 Fixador Metanol-Ácido Acético 3:1

| <b>Constituinte</b>   | <b>Concentração</b> |
|-----------------------|---------------------|
| Metanol               | 30 mL               |
| Ácido Acético glacial | 10 mL               |

## 4.1.4.0 Tampão de Sorensen

| <b>Constituinte</b>                | <b>Concentração</b> |
|------------------------------------|---------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | 5,26 g              |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 8,65 g              |
| H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p. | 1000 mL             |

Ajustado o pH para 7,0

## 4.1.4.1 Giemsa

| <b>Constituinte</b> | <b>Concentração</b> |
|---------------------|---------------------|
| Giemsa              | 3,0 g               |
| Glicerina           | 162 mL              |

**Observações:**

Em frasco âmbar, o giemsa foi misturado à glicerina em banho-maria 60°C overnight. Posteriormente, foi adicionado 252 mL de metanol e homogeneizado.

#### 4.1.4.2 Corante final de Giemsa 5%

| Constituinte       | Concentração |
|--------------------|--------------|
| Tampão de Sorensen | 50 mL        |
| Giemsa             | 2,5 mL       |

#### 4.1.5 Materiais para Formação e Análise dos Filmes

Os materiais que foram usados são: Eudragit® RS 30D (copolímero acrilato-metacrilato com grupos amônio quaternário tipo B, *USP/NFR*Röhm Pharma, Darmstadt – Alemanha), Eudragit® FS 30D (copolímero aniônico baseado no acrilato-metacrilato, metil-metacrilato e ácido metacrílico, Evonik®), Citrato de trietil (TEC) (Morflex® – EUA), Fluido de Simulação Gástrica (FSG) e Fluido de Simulação Intestinal (FSI) preparado de acordo com a farmacopéia americana USP 23ª edição.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preservação do Microrganismo

A preservação do *B. subtilis* foi realizada no meio 4.1.2.1, a uma temperatura de 37 °C. Após crescimento, as culturas foram mantidas a temperatura de 4 °C sendo repicados a cada 45 dias. A pureza foi verificada por teste de gram.

#### 4.2.2 Pré – Inóculo

O pré – inóculo foi obtido através de fermentação por batelada, em erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de fermentação (4.1.2.2) durante 48 horas a 37 °C. Para o processo de inoculação, o pré – inóculo foi centrifugado a 4300 g por 20 min. O precipitado de células foi re-suspenso em NaCl 0,9% e a concentração das células foi calculada por turbidimetria a 400 nm comparada a uma curva padrão de biomassa. Todos os inóculos foram padronizados em 0,2 g/L.

#### 4.2.3 Produção de Levana através do Planejamento Fatorial e Análise por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Para otimizar as condições de produção de levana, pelo *B. subtilis* NATTO, foi aplicado um planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta (BOX, HUNTER e HUNTER, 1976). A significância dos efeitos das variáveis independentes: tempo de cultivo e concentração de sacarose, na produção de levana, foram avaliadas em cultivos submersos, no meio descrito 4.1.2.3; variando-se a concentração de sacarose conforme planejamento proposto. Foi utilizado um planejamento fatorial completo com dois fatores em três níveis de variação  $2^3$ , para identificar os efeitos das variáveis na produção de levana. Os valores das variáveis independentes, pontos fatoriais e centrais, para o tempo de cultivo (X1) foram 12, 24 e 36 horas e para a concentração de sacarose (X2) foram 100, 200 e 300 g/L (Tabela 2). As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio a 37°C e 150 rpm. A concentração de levana, inferida pela concentração de unidades de frutose, foi escolhida como variável dependente e dosada do sobrenadante após interrupção da fermentação com proteases e conseguinte filtração.

**Tabela 6** – Delineamento fatorial completo  $3^2$  para avaliar os efeitos das variáveis tempo de cultivo ( $X_1$ ) e concentração de sacarose ( $X_2$ ) na produção de levana por *B. subtilis* NATTO.

| (*)<br>Ensaio | Variáveis codificadas |       | Variáveis Originais |                    |
|---------------|-----------------------|-------|---------------------|--------------------|
|               | $X_1$                 | $X_2$ | Tempo (h)           | Concentração (g/L) |
| 1             | -1                    | -1    | 12                  | 100                |
| 2             | 1                     | -1    | 36                  | 100                |
| 3             | -1                    | 1     | 12                  | 300                |
| 4             | 1                     | 1     | 36                  | 300                |
| 5             | 0                     | 1     | 24                  | 300                |
| 6             | 0                     | -1    | 24                  | 100                |
| 7             | 1                     | 0     | 36                  | 200                |
| 8             | -1                    | 0     | 12                  | 200                |
| 9 (C)         | 0                     | 0     | 24                  | 200                |

(\*) Os ensaios foram aleatorizados

Após obtenção das respostas do primeiro planejamento fatorial, foi realizado o *steepest ascent* (caminho da máxima inclinação ascendente), seguido de um planejamento fatorial fracionado de segunda ordem ( $2^2$ ) com dois pontos centrais localizados e pontos estrela (Tabela 3). As mesmas variáveis do delineamento fatorial estatístico inicial foram testadas. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software *Statistic 6.0*.

**Tabela 7** – Delineamento fatorial fracionário  $2^2$  com pontos estrela para avaliar os efeitos das variáveis tempo de cultivo ( $X_1$ ) e concentração de sacarose ( $X_2$ ) na produção de levana por *B. subtilis* NATTO.

| (*)<br>Ensaios | Variáveis codificadas |       | Variáveis Originais |                    |
|----------------|-----------------------|-------|---------------------|--------------------|
|                | $X_1$                 | $X_2$ | Tempo (h)           | Concentração (g/L) |
| 1              | -1                    | -1    | 8                   | 200                |
| 2              | -1                    | 1     | 8                   | 600                |
| 3              | 1                     | -1    | 24                  | 200                |
| 4              | 1                     | 1     | 24                  | 600                |
| 5              | -1,8                  | 0     | 1`36``              | 400                |
| 6              | 1,8                   | 0     | 30`24``             | 400                |
| 7              | 0                     | -1,8  | 16                  | 40                 |
| 8              | 0                     | 1,8   | 16                  | 760                |
| 9 (C)          | 0                     | 0     | 16                  | 400                |
| 10 (C)         | 0                     | 0     | 16                  | 400                |

(\*) Os ensaios foram aleatorizados

#### 4.2.4 Fermentação em Escala Maior

Fermentações na obtenção da levana foram realizadas em batelada a partir do ponto ótimo observado no planejamento fatorial e superfície de resposta (meio descrito em 4.1.2.3). A sacarose utilizada foi a comercial. A pré-inoculação foi realizada conforme item 4.2.2. Foram usados erlenmeyers de 2 L com volume de trabalho de 500 mL. As condições de fermentação foram: temperatura de 37°C, 16 h, a 150 rpm em mesa agitadora. A interrupção da fermentação foi realizada conforme item 4.2.5.

#### 4.2.5 Tratamento do Fermentado com Protease

Ao final das fermentações, o pH dos cultivos foi corrigido para 8,5 com NaOH 2N. Posteriormente, foram adicionados 20 mg de protease a cada 500 mL de meio fermentado. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 60°C com agitação de 30 segundos a cada 15 minutos. A inativação da enzima foi realizada em banho fervente por 10 minutos. As amostras foram então filtradas retirando-se a biomassa.

#### 4.2.6 Precipitação e Liofilização da Levana

O volume total da fermentação, isenta de células, foi precipitado com etanol 95% (1:3). A levana precipitada foi lavada com água destilada, liofilizada e verificada a contaminação de proteínas conforme reação de Ninhidrina (MOORE e STEIN, 1948).

#### 4.2.7 Quantificação da Levana

Para determinação espectrofotométrica da levana, 0,3 mL do filtrado e 0,9 mL de etanol 95% foram misturados, seguindo de agitação em vortex, para a precipitação do EPS. A mistura foi armazenada a 4°C por 12 horas e centrifugada a 14000 rpm por 30 minutos. No precipitado (levana) foi adicionado 1 mL de HCl 0,1N e deixado a 100°C durante 1 hora; em seguida neutralizada com 0,1 mL de NaOH a 2M (Ananthalaksmi e Gunasekaran, 1999). O EPS foi determinado pelo método de Somogy-Nelson através da quantificação dos açúcares redutores totais presentes após hidrólise. Uma curva padrão foi confeccionada com frutose, variando-se a concentração de 0 a 100 µg/ml e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda -  $\lambda=540$  nm (ANEXO B).

#### 4.2.8 Estimativa da Massa Molar da Levana por Cromatografia de Exclusão Molecular

A levana precipitada do meio de fermentação foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sepharose 6B. Este gel é de agarose a 6%, com partículas de diâmetro de 45-165  $\mu\text{m}$ ; apresenta intervalo de fracionamento para polissacarídeos  $10^4 - 10^6$  Da. (COLLINS, BRAGA e BONATO 1995). O gel foi empacotado numa coluna de 1,6 cm de diâmetro com 40 cm de comprimento, volume de 80,43 mL.

O eluente foi o tampão fosfato 50 mM em pH 7,0, previamente desaerado em sistema a vácuo. A vazão do eluente foi de 14mL/h, controlada por bomba peristáltica. Os volumes coletados foram de 3,5 mL a cada 15 minutos. As amostras de 0,5 mL foram aplicadas a 4 mg/mL. Os açúcares eluídos foram dosados pelo método fenol-sulfúrico.

A partir dos padrões de dextrana de *Leuconostoc mesenteroides*, foi confeccionada a curva de calibração com os padrões de 50.000, 410.000 e 670.000 Da (ANEXO C).

#### 4.2.9 Composição dos Monossacarídeos da Levana por Cromatografia Líquida de Alta Pressão em Coluna de Troca Aniônica (HPAEC)

Para avaliação da composição dos monossacarídeos da levana uma amostra do EPS hidrolisado, contendo 40,0  $\mu\text{g/mL}$  de açúcares totais, foi analisada. A amostra foi hidrolisada pela adição de 1,0 mL de HCl 0,1 N em ampola de vidro fechada hermeticamente e submetida a 100°C por 1 h. O ácido foi neutralizado com NaOH 0,1N (Ananthakshmy e Gunasekaran, 1999). A mesma concentração do ácido foi utilizada para as condições 60°C/1 h e 100°C/2 h, para avaliação das condições de hidrólise.

Para fins comparativos, utilizou-se como padrão uma mistura contendo 20  $\mu\text{g/mL}$  de cada um dos seguintes monossacarídeos: L-frutose, L-glucose e 20  $\mu\text{g/mL}$  de sacarose.



Os monossacarídeos foram quantificados por cromatografia líquida de troca iônica de alta pressão, consistindo de um sistema Dionex DX 500 e um Detector de Amperometria Integrada (IAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares foram separados isocraticamente (NaOH 14mM) usando uma coluna analítica CarboPac PA1 (4x250mm) equipada com uma pré-coluna PA1 a velocidade de fluxo de 1,0 mL/min. As condições de eluição foram produzidas usando H<sub>2</sub>O deionizada (eluente 1) e NaOH 200mM (eluente 2), preparada a partir de solução de NaOH 50%. A coluna foi regenerada após 25 min. de corrida com 100% do eluente 2, por 10 min., seguida pelo retorno de água deionizada.

#### 4. 2. 10 Determinação da Viscosidade da Levana Produzida pelo *B. subtilis* NATTO

Para determinação da viscosidade, foi utilizado um viscosímetro modelo LVDV-I+ - Brookfield ®. A levana foi produzida conforme item 4.1.2.3 nas seguintes condições de fermentação: temperatura de 37°C, 16 h, a 150 rpm em mesa agitadora. A viscosidade foi avaliada em solução 33,1 % baseado no peso da levana não liofilizada. As leituras foram anotadas quanto torques (%), rotações (rpm) e centipoise (cP).

#### 4.2.11 Meio de Cultura para Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO-K1) nos Testes de Toxicidade da Levana

Para os testes de citotoxicidade e mutagenicidade, o meio foi preparado em balão volumétrico de 1000 mL. O meio de cultura (4.1.3.2) foi solubilizado em 500 mL de água destilada e acrescentado posteriormente o bicarbonato de sódio e solução antibiótica-antimicótica. Em seguida o conteúdo foi homogeneizado e completado o volume para 1000 mL com água destilada. A agitação foi realizada por cerca de 15 minutos protegido da luz direta. O pH foi corrigido para 7,2 e, em seguida, filtrado em membrana de 0,22 µm em condições

estéreis. O meio foi guardado em frascos esterilizados. Foi adicionado 10% de soro bovino fetal conforme os frascos aliquotados iam sendo utilizados.

#### 4.2.12 Descongelamento das células CHO-K1

As células estocadas em nitrogênio líquido, após descongelamento, foram transferidas para o frasco de cultura com 10 mL de meio de cultura (4.2.11). Em seguida foram incubadas a 37°C por 24 h.

#### 4.2.13 Repique e Manutenção das Células

Para repique e manutenção das células CHO-K1, foi descartado o meio de cultivo do frasco da cultura descongelada. As células foram então lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e o excesso de PBS foi retirado com o auxílio de pipeta Pasteur. As células foram tratadas com a adição de 0,5 mL de tripsina por 2 min., seguida pela adição de 1,5 mL de meio de cultura. Formou-se então a suspensão celular. Para manutenção, foi utilizado 2 gotas da suspensão celular para cada frasco de cultura contendo 10 mL de meio de cultura. O frasco de repique, ou pré-frasco, foi obtido adicionando-se 10 gotas da suspensão celular em 5 mL de meio de cultura.

#### 4.2.14 Citotoxicidade: Teste do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

Para os testes de citotoxicidade utilizaram-se três placas de Elisa com 100 µL do meio de cultura (4.2.11) e com  $2,5 \cdot 10^4$  células CHO-K1 em cada poço. Foi reservado duas colunas para o branco, uma linha para o metilmetano sulfonato ( $3,33 \cdot 10^{-5}$  mol/mL) (indutor) e uma linha para o controle. Após 24 h de

incubação a 37°C (para estabilização da cultura), foi retirado o meio de cultura dos poços e adicionado 200 µL da levana em diferentes concentrações. Para os testes foram utilizados 5 tratamentos, com adição de levana nas seguintes concentrações 80,160,240, 320 e 400 µg/mL. O meio de cultura, nesta etapa, foi sem a adição de soro bovino fetal. Cada placa, após o tratamento com diferentes concentrações de levana, foi incubada a 37°C por 24 h. Após a incubação, foram retirados os tratamentos e adicionado 150 µL de MTT (3,33 g/mL) em cada poço por 4 h. Em seguida o MTT foi retirado e foi adicionado 150 µL de dimetil sulfoxido. As leituras foram a 550 nm em Microelisa readers.

#### 4.2.15 Mutagenicidade: Teste do Micronúcleo

##### 1) Tratamento

Para os testes de mutagenicidade os cultivos das células CHO-K1, após 72 h de crescimento, foram tratados com tampão fosfato salino (PBS), tripsinizados, misturados e distribuídos na concentração de  $0,95 \cdot 10^6$  células CHO-K1 em 4 frascos de tratamento contendo 5 mL de meio de cultura e incubados por 24 h a 37°C.

Após 24 h de estabilização, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS em temperatura ambiente. O excesso de solução foi removido com pipeta Pasteur e foram iniciados os tratamentos, adicionando-se 5mL de meio de cultura contendo 400 µg/mL e 1200 µg/mL de levana. Para controle positivo, ou indutor, foi utilizado o metilmetano sulfato ( $2 \cdot 10^{-4}$  M); o controle negativo continha apenas as células CHO-K1 com o meio de cultura.

Os tratamentos foram incubados por 24 h a 37°C. Terminado o período de incubação, As culturas foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS em temperatura ambiente. Foi adicionado meio de cultura novo e 50 µL de citocalasina B 300 µg/mL por 24 h. Após tratamento com citocalasina, os frascos foram encaminhados para a colheita de micronúcleo.

## 2) Colheita de Micronúcleos para Células CHO-K1

Foram reservados o meio de cultura dos frascos-tratamento e controle positivo e negativo. As células foram então lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e o excesso removido com pipetas de Pasteur. As células foram então soltas com a adição de 0,5 mL de tripsina 0,025%. A inativação da enzima foi realizada com a adição do meio de cultura reservado anteriormente. Após inativação, foi adicionado uma gota de formol, homogenizado e centrifugado (1250 rpm por 5 minutos). Após centrifugação, foi desprezado o sobrenadante, deixando 1,5 mL de meio de cultura, e adicionado 1,5 mL citrato de sódio em temperatura ambiente pela parede do frasco. Novamente o conteúdo foi homogeneizado e centrifugado (1250 rpm por 5 minutos) seguindo com o descarte total do sobrenadante. Em seguida o sedimento foi suspenso em PBS q.s. Após suspensão, foi adicionado 5 mL de fixador metanol/ácido acético e rapidamente homogeneizado e centrifugado (1250 rpm/ 5 minutos). O sobrenadante foi descartado. A adição de fixador foi realizada novamente obtendo-se a diluição desejada q.s.

Em seguida foi depositada uma gota da suspensão de células sobre a lâmina limpa e gelada contendo um filme de água. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas cobrindo-as com cerca de 5 mL de Giemsa 5% durante 5 minutos. Após coloração, o corante foi removido em água corrente. As lâminas foram secadas em temperatura ambiente e levadas para estudos no microscópio. As lâminas foram analisadas contando-se 1000 células binucleadas por tratamento, contabilizando as células binucleadas portadoras de micronúcleos.

### 4.2.16 Preparação dos Filmes

Os filmes foram preparados a partir de dispersões em base aquosa, inclusive a solubilização da levana. Foi utilizado o método convencional para polímeros termoplásticos e termorrígidos, denominado evaporação ou “casting process” (SIPOS et al., 2008; TARANTILI e KOUMOULOS, 2008). A dispersão polimérica de base aquosa foi preparada em quatro diferentes concentrações

variando a concentração de levana. A massa polimérica final será sempre de 4% (p/v) ou 4g/100 mL. As diferentes proporções poliméricas estão expressas conforme Tabela 4. Os filmes a base de Eudragit® RS e FS 30D foram confeccionados separadamente, embora, para simplificação, estejam agrupados na mesma tabela. O plastificante escolhido foi o citrato de trietila (TEC), adicionado na concentração de 20% em relação, exclusivamente, à massa do polimetacrilato Eudragit® RS 30 D (ABBASPOUR, SADEGHI e GAREKANI, 2008). Para o polímero Eudragit® FS 30D, foi usado uma dispersão 5% de monoestearato de glicerila (MEG) e 2% de tween 80 como agente deslizante (IBEKWE et al., 2006).

**Tabela 8** – Quantidade de polímeros e levana usados para um volume de 100 mL de filme.

| <b><i>Eudragit®RS30D</i></b><br><b>ou</b><br><b><i>Eudragit®FS30D</i></b><br><b>(g)</b> | <b>Levana</b><br><b>(g)</b> |
|---|-----------------------------|
| 4,0 (100%)  | 0,0 (0%)                    |
| 3,8 (95%)   | 0,2 (5%)                    |
| 3,6 (90%)   | 0,4 (10%)                   |
| 3,2 (80%)   | 0,8 (20%)                   |

As dispersões contendo o Eudragit® RS 30 D e FS 30D, acrescidas do TEC a 20% e MEG 5% respectivamente, foram deixadas sob agitação magnética por um período de 30 minutos em temperatura ambiente (TE= 25°C ± 2.0). Após completa homogeneização das dispersões, foram adicionadas suavemente, as quantidades variáveis da levana. A solução foi mantida sob agitação magnética por mais 60 minutos em temperatura ambiente. Durante todo o processo de homogeneização foi utilizada bomba de vácuo visando evitar a incorporação de ar e formação de bolhas às misturas poliméricas. Após completa homogeneização das

diferentes dispersões, amostras de 10 mL, de cada dispersão, foram vertidas sobre os orifícios previamente demarcados na placa de Teflon®. Esta placa foi nivelada e mantida a 50°C (temperatura mínima para formação dos filmes) por período de aproximadamente 24 horas até a formação dos filmes (CAVALCANTI et al., 2002).

#### 4.2.17 Caracterização Morfológica Macroscópica e Determinação da Espessura dos Filmes

Foram selecionados filmes que não possuíam rachaduras, bolhas de ar ou quaisquer imperfeições que poderiam interferir na reprodutibilidade dos ensaios propostos. A uniformidade de espessura foi provada, utilizando um Micrômetro (Mitutoyo®), a partir de 5 pontos escolhidos aleatoriamente na superfície de cada filme. As membranas selecionadas foram acondicionadas em dissecador (contendo sílica gel) até o momento de realizar os testes posteriores (OLIVEIRA e CAVALCANTI, 2007; YE et al., 2007).

#### 4.2.18 Transmissão de Vapor d'água (TVA)

O estudo de TVA foi desenvolvido em conformidade com método "B" da *ASTM (American Society for Testing and Materials)* designado E96-66. Inicialmente, no interior de cada cúpula de permeabilidade (modelo *Payne permeability cup*, Bélgica), foram adicionados 10,0 mL de água destilada. Em seguida, os filmes candidatos à investigação, com área de 9,62 cm<sup>2</sup>, foram fixados às cúpulas individualmente. O conjunto (cúpula + água destilada + amostra filme) foi pesado no tempo zero e armazenado em dissecador contendo sílica-gel. As cúpulas, em triplicata, de cada filme, foram pesadas nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, respectivamente. A cada intervalo de tempo pré-estabelecido, a sílica-gel foi trocada por outra desidratada (50°C/24h). Os pesos perdidos pelas cúpulas nos respectivos intervalos de tempo foram registrados e aplicados na Equação 1. Esta

equação forneceu a taxa de transmissão de vapor d'água transportada através dos filmes isolados.

$$TVA = \frac{g \times 24}{t \times a} \dots\dots\dots \text{Equação (1)}$$

Onde, *g* é a perda de peso em gramas, *t* é tempo em horas e *a* a área do filme.

#### 4.2.19 Determinação do Índice de Intumescimento (Ii%)

Os filmes das diferentes associações propostas foram minuciosamente cortados com tesoura cirúrgica (modelo *Professional F/1*) em aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup>. A seguir foram distribuídos no interior de placas de Petri devidamente identificadas. Posteriormente, as placas de Petri foram colocadas em estufa a 50°C, por aproximadamente 24 horas, atingindo perda total da umidade. Após este tempo, as placas foram retiradas e mantidas em dissecadores durante a realização do experimento. As amostras secas das diferentes associações foram pesadas em balança analítica, imediatamente imersas em recipientes contendo Fluido de Simulação Gástrica (FSG) para filmes a base de Eudragit FS 30D/Levana e Fluido de Simulação Intestinal (FSI) e FSG para filmes a base de Eudragit RS 30D/Levana, sem a presença de enzimas, e mantidas por diferentes intervalos de tempo à temperatura ambiente. Tais fluidos foram feitos segundo a 23<sup>a</sup> Farmacopéia dos Estados Unidos (*USP XXIII*). Cumpridos os intervalos de tempo pré-estabelecidos, as amostras foram removidas dos meios com auxílio de pinça e cuidadosamente enxugadas entre duas folhas de papel de filtro e repesadas. O mesmo procedimento foi adotado para todas as outras amostras mantidas por períodos correspondentes aos intervalos de 1 a 10, 30, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos de imersão. Para o cálculo do índice de intumescimento (Ii%) foi utilizada a Equação 2 segundo Blanchon et al., 1991.

$$li\% = \frac{(P_i - P_s)}{P_s} \times 100 \dots\dots\dots \text{Equação (2)}$$

Onde  $P_i$  é o peso do filme intumescido e  $P_s$  é o peso do filme seco.

#### 4.2.20 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para as análises de DSC, uma pequena quantidade das amostras (6 mg), padrão e associações, foram aprisionadas em cadinho de alumínio com tampa furada e submetidos a programa de aquecimento controlado. Os ensaios foram realizados em calorímetro diferencial de varredura marca Netzsch modelo DSC – 204 em uma atmosfera com fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. A faixa de temperatura foi de 0 - 600°C a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto. Antes disso, foi aplicada uma isoterma de 100 °C por 15 minutos objetivando a perda total da umidade. A diferença de fluxo de calor da amostra e do padrão foi controlada pela variação da entalpia e demonstrada em gráfico por picos endotérmicos e exotérmicos.

#### 4.2.21 Análise Termogravimétrica (TGA)

Foram conduzidos experimentos para investigar a estabilidade térmica, por termogravimetria, tanto dos polímeros sintéticos quanto das diferentes associações candidatas, utilizando aparelho Netzsch modelo DSC-204. Foram utilizadas aproximadamente 10 mg em uma atmosfera de fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. A faixa de temperatura foi de 0 - 500°C a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto.



#### 4.2.22 Análise Estatística

As análises estatísticas foram usadas para determinar o nível de significância existente entre os valores obtidos em todos os ensaios envolvendo os filmes. As análises estatísticas de produção da levana bem como do planejamento fatorial e superfície de resposta, foram realizadas pelo programa Statistic® (versão 6.0, 2001).

As análises de citotoxicidade e mutagenicidade (4.2.14 e 4.2.15) foram analisados pelo programa GraphPad InStat (versão 3.02, 1998) pelo teste de Tukey para múltipla comparação das médias.

Os demais ensaios foram analisados pelo programa *GraphPad Prism*® (versão 2.01, 1996). Os diferentes resultados referentes aos coeficientes de índice de intumescimento e transmissão de vapor d'água, que foram obtidos nas diferentes circunstâncias (meio de simulação do TGI), foram inicialmente avaliados usando análise de variância (ANOVA), sendo os resultados sempre significativos quando  $p < 0,05$ . Quando o conjunto desses valores forneceu parâmetros significativos, foi realizada aplicação das médias dos dados obtidos no teste de múltipla comparação de Tukey. Está análise comparará o efeito das diferentes composições poliméricas. A significância foi quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 PRODUÇÃO DA LEVANA

A produção de levana, por *B. subtilis*, é influenciada por diversos fatores; dentre eles as condições específicas de crescimento celular e composição do meio de cultura. A composição correta do meio de cultura é de grande importância para a produção de levana; haja vista que a produção metabólica da levana acompanha o crescimento da biomassa (SHIH et al., 2005). Nesta perspectiva, pesquisas foram realizadas para se obter as melhores composições do meio cultivo, para produção de levana; objetivando um bom crescimento da biomassa bacteriana. Os trabalhos de Calazans et al. (2000) e Euzenat, Guilbert e Combes (1996) foram úteis para fornecer tais informações.

Fatores de estresse também foram necessários na produção de Levana. Singh e Fett (1995) afirmaram que o aumento da osmolaridade e a desidratação são importantes fatores na produção de EPS; em especial o alginato e a levana. A adição de NaCl e etanol, visando o aumento da osmolaridade e desidratação no meio de cultura, aumentaram a capacidade de produção de levana na *Pseudomonas pv. phaseolicola*. Shih et al. (2005) estudaram a produção e caracterização de levana, produzida pelo *B. subtilis*, isolada do Natto. Os autores utilizaram, com a finalidade de aumentar a osmolaridade e assim o estresse, um meio saturado a 20% (p/p) de sacarose.

De acordo com tais observações, este trabalho guiou-se utilizando o aumento de osmolaridade como fator de estresse para a produção de levana por *B. subtilis*. Ainda segundo Abdel-Fattah, Mahmoud e Esawy (2005), a levanasacarase é produzida de modo induzível, pelo *Bacillus subtilis* NRC 33a, quando usado sacarose como fonte de carbono. Sendo assim, justifica-se o uso do aumento da osmolaridade, com altas concentrações de sacarose, para a indução da levanasacarase na produção de levana. No mesmo estudo foi verificada a importância do tempo de fermentação no rendimento da levana.

Outros estudos também sugeriram a importância do tempo de cultivo na produção de levana; Shih et al. (2005) verificaram a importância do tempo de cultivo na produção de levana de alta massa molar por *B. subtilis* isolado do Natto.

Considerando a importância dos fatores concentração de sacarose e tempo de cultivo, na produção de levana, realizou-se uma otimização de produção de levana através do planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta.

**Os resultados serão apresentados na forma de artigos científicos:**

**ARTIGO A – CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA E OTIMIZAÇÃO DA SUA PRODUÇÃO PELO *BACILLUS SUBTILIS* NATTO. EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE, SUBMETIDO À “FOOD MICROBIOLOGY” (NORMAS DE PUBLICAÇÃO NO ANEXO E). PG. 66**

**ARTIGO B – LEVANA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVO MATERIAL POLIMÉRICO: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE, HIDRATAÇÃO E ANÁLISES TÉRMICAS EM FILMES ISOLADOS DE EUDRAGIT FS30D®, SUBMETIDO À “WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY” (NORMAS DE PUBLICAÇÃO NO ANEXO F). PG. 90**

**ARTIGO C – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE, HIDRATAÇÃO E ANÁLISES TÉRMICAS DE FILMES ISOLADOS DE EUDRAGIT RS 30D® ADITIVADOS COM LEVANA DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO. MATERIAL CANDIDATO AO REVESTIMENTO FARMACÊUTICO, SUBMETIDO À APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY (NORMAS DE PUBLICAÇÃO NO ANEXO F). PG. 107**

**ARTIGO A – CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA E OTIMIZAÇÃO DA SUA  
PRODUÇÃO PELO *BACILLUS SUBTILIS* NATTO. EFEITO DA TEMPERATURA E  
CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE, SUBMETIDO À “FOOD MICROBIOLOGY”  
(NORMAS DE PUBLICAÇÃO NO ANEXO E). PG. 66**

**Leandro Freire dos SANTOS\*, Sandra Regina LEPRI, Wagner José Martins  
PAIVA, Maria Antonia Pedrine Colabone CELLIGOI**

**CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA E OTIMIZAÇÃO DA SUA PRODUÇÃO PELO  
BACILLUS SUBTILIS NATTO. EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO  
DE SACAROSE, SUBMETIDO À “FOOD MICROBIOLOGY” (NORMAS DE  
PUBLICAÇÃO NO ANEXO E). PG. 66**

**Leandro Freire dos SANTOS<sup>1\*</sup>, Sandra Regina LEPRI<sup>2</sup>, Wagner José Martins  
PAIVA<sup>2</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone CELLIGOI<sup>1</sup>**

**Resumo**

Exopolissacarídeos têm ganhado grande destaque, nesta última década, na indústria alimentícia. A levana, um exopolissacarídeo à base de frutose, tem sido utilizada como estabilizante, fixador de sabores, cores e espessante para vários alimentos. Condições otimizadas de produção fazem-se necessárias para melhor aplicação industrial. Este trabalho objetivou otimizar a produção de levana, produzida pelo *B. subtilis* isolado do Natto, por planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta, bem como caracterizá-la quanto à massa molar, comportamento reológico e toxicidade. Diante das variáveis independentes pesquisadas, o delineamento experimental apresentou os melhores resultados em 400 g/L de sacarose/ 16 h de tempo de cultivo; com o rendimento de 111,6 g/L de levana. Nestas condições otimizadas a amostra apresentou, conforme quantidade total de açúcares eluídos, levana de duas massas moleculares, aproximadamente 568.000 Da e < 50.000 Da; nas quantidades 13,39 e 86,61% respectivamente. Conforme avaliação da viscosidade, mediante variação da taxa de cisalhamento, a levana apresentou um comportamento Newtoniano. A levana não se apresentou tóxica ou genotóxica. De acordo com a citotoxicidade, nenhum dos tratamentos mostrou-se citotóxico para as células CHO-K1 ( $p>0,05$ ), bem como nenhum tratamento aumentou a frequência de micronúcleos para células CHO-K1 quando comparado com o controle; não apresentando potencial mutagênico.

**Palavras-chave:** Levana. Produção. Planejamento fatorial. Caracterização. Massa molar. Citotoxicidade. Micronúcleo

---

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, SC 86051-990 Londrina, Brasil. \*Corresponding author. Tel.: +55 44 9989 2982 E-mail address: leandrofreire@onda.com.br (L.F. Santos)

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, SC 86051-990 Londrina, Brasil

## 1 INTRODUÇÃO

A levana é um polissacarídeo extracelular constituída predominantemente por resíduos de D-frutose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6); podendo ainda apresentar pontos de ramificações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) e um resíduo de glucose terminal (Arvidson et al. 2006).

A levana apresenta ampla aplicação industrial e tecnológica. Grande destaque na indústria alimentícia; aonde é utilizada como estabilizante, fixador de sabores, cores e espessante para vários alimentos; sendo utilizada também na elaboração de produtos dietéticos (Duboc e Mollet, 2001).

Diante das aplicações vindouras e atuais da levana, faz-se necessário pesquisar fontes alternativas de produção, bem como otimizá-la. Diversos microrganismos, nesta última década, têm sido propostos como potenciais produtores de levana. Oliveira et al. (2007) concluíram a *Zymomonas Mobilis* como potencial produtor de levana; obtendo, em condições otimizadas por planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta, até 21,68 g/L de levana.

A caracterização da massa molar da levana finda-se como importante etapa na correta aplicação das condições otimizadas de produção; sabe-se que determinadas funções ou atividades biológicas são estritas a certas faixas de massa molar. Calazans et al. (2000) relacionaram a atividade antitumoral da levana com a massa molar do exopolissacarídeo (EPS). Ocorreu uma faixa de massa molar com máxima atividade contra o tumor. Ammar et al. (2002) afirmaram que a levana de alta massa molar possui efeitos benéficos nos níveis séricos de colesterol e triacilglicerídeos em humanos e animais.

A caracterização reológica da levana torna-se imprescindível para sua aplicabilidade industrial principalmente na área alimentícia. Existem poucos dados na literatura sobre a caracterização reológica da levana produzida pelo bacilo isolado do Natto. O comportamento da viscosidade da levana, mediante variação da taxa de cisalhamento, é um importante teste no âmbito de metodologias para caracterização reológica; haja vista a possível variação da viscosidade e escoamento de líquidos não-Newtonianos frente às mudanças na taxa de cisalhamento (Bae et al., 2008).

Caracterizações do âmbito toxicológico também devem ser realizadas na produção de substância com possível aplicação humana. Os testes

de toxicidade celular fornecem as primeiras informações sobre a segurança dos compostos em teste. Muitas moléculas promissoras podem ser descartadas, logo no início, devido à sua citotoxicidade. Assim o teste de citotoxicidade utilizando o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MTT) foi aplicado para verificar a segurança da aplicação da levana na indústria alimentícia. A genotoxicidade, por meio da metodologia de micronúcleo, também se faz necessário para prognosticar uma potencial atividade mutagênica e/ou carcinogênica (Miranda et al., 2008).

Um *B. subtilis*, isolado do alimento japonês Natto pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e identificado pela Fundação André Tosello, mostrou-se em testes prévios, estimada produção de levana. Diante disso, este estudo objetivou, primordialmente, os estudos iniciais de otimização da produção de levana. Amparando este objetivo principal, estudos adicionais no que diz respeito à massa molar, caracterização reológica e dados toxicológicos da levana produzida foram realizados com o intuito de ampliar sua aplicabilidade industrial.

## 2 MÉTODOS

### 2.1 PRODUÇÃO DE LEVANA

#### 2.1.1 Microrganismo e Condições de Fermentação

O *B. subtilis*, isolado do alimento japonês Natto pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e identificado pela coleção de culturas tropicais André Tosello – Campinas SP, foi mantido em meio de cultura contendo em g/L: Peptona 5,0; Extrato de carne 3,0 e Agar 2,0. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 min. As culturas foram mantidas a 4°C e renovadas a cada 45 dias. O meio para o pré-inóculo continha 100 g/L de sacarose e sais conforme Calazans et. al (2000). A concentração de células foi padronizada em 0,2 g/L. A concentração de células foi determinada por turbidimetria a 400 nm. Fermentações em batelada forma conduzidas utilizando frascos erlenmeyers de 250 mL com 50mL de meio de fermentação a 37°C, 150 rpm.

### 2.1.2 Meio de Fermentação

Foram utilizados, no meio de cultura, sacarose comercial conforme planejamento fatorial proposto. Demais sais utilizados foram em g/L: Extrato de levedura 2,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,06;  $\text{MnSO}_4$  0,02 e água destilada qsp. Todos os sais são de grau analítico.

### 2.1.3 Planejamento Fatorial

Inicialmente foi utilizado um planejamento fatorial completo com dois fatores em três níveis de variação  $2^3$ , para identificar os efeitos das variáveis tempo de cultivo ( $x_1$ ) e concentração de sacarose ( $x_2$ ) na produção de levana (Tabela 1). Após obtenção das respostas do primeiro planejamento fatorial, foi realizado o caminho da máxima inclinação ascendente, seguido de um planejamento fatorial fracionado de segunda ordem ( $2^2$ ) com dois pontos centrais localizados e pontos estrela (Tabela 2). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software *Statistic* 6.0.

### 2.1.4 Métodos Analíticos

Após cada fermentação, foram adicionadas proteases ( $40,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ; pH 8,5) aos meios de fermentação e conseqüente filtração para interrupção da fermentação. A levana (LEV) foi precipitada do extrato livre de células com etanol absoluto (1:3) gelado ( $5^\circ\text{C}$ ). Contaminação protéica foi verificada conforme reação de Ninhidrina (Moore e Stein, 1948). O rendimento de levana foi inferida pela quantidade de açúcares redutores por Somogyi (1952) e Nelson (1944) após hidrólise com 1 mL de HCl 0,1N ( $100^\circ\text{C}$ , 1 h).



## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA DE *B. SUBTILIS* NATTO

### 2.2.1 Análise da Composição Monossacarídica por Cromatografia Líquida de Alta Pressão em Coluna de Troca Aniônica (HPAEC)

A levana, após precipitação e hidrólise, foi avaliada quanto à composição dos monossacarídeos. Os monossacarídeos foram quantificados por cromatografia líquida de troca iônica de alta pressão, consistindo de um sistema Dionex DX 500 e um Detector de Amperometria Integrada (IAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares foram separados isocriticamente (NaOH 14mM) usando uma coluna analítica CarboPac PA1 (4x250mm) equipada com uma pré-coluna PA1 a velocidade de fluxo de 1,0 mL/min. As condições de eluição foram produzidas usando H<sub>2</sub>O deionizada (eluente 1) e NaOH 200mM (eluente 2), preparada a partir de solução de NaOH 50%. A coluna foi regenerada após 25 min de corrida com 100% do eluente 2, por 10 min., seguida pelo retorno de água deionizada.

### 2.2.2 Estimativa da Massa Molar da Levana por Cromatografia de Exclusão Molecular

A levana precipitada das fermentações foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sepharose 6B (Sigma). O gel foi empacotado numa coluna de 1,6 cm de diâmetro com 40 cm de comprimento, volume de 80,43 mL. O eluente foi o tampão fosfato 50 mM em pH 7,0, previamente desaerado em sistema a vácuo. A vazão do eluente foi de 14mL/h, controlada por bomba peristáltica. Os volumes coletados foram de 3,5 mL a cada 15 minutos. As amostras de 0,5 mL foram aplicadas a 4 mg/mL. Os açúcares eluídos foram dosados pelo método fenol-sulfúrico. A partir dos padrões de dextrana de *Leuconostoc mesenteroides*, foi confeccionada a curva de calibração com padrões de 50 K, 410 K e 670 K Da.

### 2.2.3 Determinação da Viscosidade da Levana

Para determinação da viscosidade, foi utilizado um viscosímetro modelo LVDV-I+ - Brookfield ®. A viscosidade foi avaliada em solução 33,1 % baseado no peso da levana não liofilizada. As leituras foram anotadas quanto torques (%), rotações (rpm) e centipoise (cP).

### 2.2.4 Avaliação da Citotoxicidade

Para este teste foi utilizado três placas de Elisa com 100 µL do meio de cultura DMEM – F12 GibcoBRL®, suplementado com 10% de soro bovino fetal, adicionados de  $2,5 \cdot 10^4$  células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) (doadas pela Universidade Federal de São Carlos) em cada poço. Foram reservadas duas colunas para o branco, uma linha para o metilmetano sulfanato MMS ( $3,33 \cdot 10^{-5}$  mol/mL) (indutor) e uma linha para o controle. Após 24 h de incubação a 37°C (para estabilização da cultura), foi retirado o meio de cultura dos poços e adicionado 200 µL da levana em diferentes concentrações (80,160,240, 320 e 400 µg/mL). O meio de cultura, nesta etapa, foi sem a adição de soro bovino fetal. Cada placa, após o tratamento com diferentes concentrações de levana, foi incubada a 37°C por 24 h. Após a incubação, foram retirados os tratamentos e adicionado 150 µL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bomídico - Sigma®) (3,33 g/mL) em cada poço por 4 h. Em seguida o MTT foi retirado e foi adicionado 150 µL de dimetil sulfóxido. As leituras foram a 550 nm em Microelisa readers.

### 2.2.5 Avaliação da Mutagenicidade: Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese

As células CHO-K1 cresceram em DMEM – F12 GibcoBRL® por 24 h antecipadamente à adição dos tratamentos para estabilização da cultura. Os tratamentos foram realizados nos seguintes termos: a) controle contendo apenas meio de cultura b) agente indutor de dano de DNA (MMS -  $2 \cdot 10^{-4}$  M) c) levana 400 µg/mL e d) levana 1200 µg/mL. Após tratamento as culturas foram incubadas por 24 h, 37°C. Terminado o período de incubação, as culturas foram lavadas duas vezes com 5 mL de tampão salino fosfato (PBS) em temperatura ambiente. Foi adicionado meio de cultura novo e 50 µL de citocalasina B 300 µg/mL por 24 h. Os

procedimentos de colheita e fixação das células foram realizados conforme Menoli et al. (2001). O critério utilizado para determinação dos micronúcleos em células binucleadas foram estabelecidas conforme Fenech (2000).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 PLANEJAMENTO FATORIAL E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

O delineamento experimental foi planejado para avaliar a influência de dois fatores (variáveis independentes), tempo de cultivo ( $X_1$ ) e concentração de sacarose ( $X_2$ ), na obtenção da levana do *B. subtilis* NATTO. O primeiro passo foi estabelecer os níveis das variáveis independentes a serem testados; os valores foram baseados nos dados da literatura (Shih et al., 2005).

A composição do meio de cultura, tempo e temperatura da fermentação foram fixadas conforme Euzenat, Guilbert e Combes (1996) e resultados obtidos previamente do planejamento fatorial completo, para produção de levana por *B. subtilis*.

**Tabela 1** – Planejamento fatorial completo ( $3^2$ ) para investigar o efeito do tempo de cultivo ( $X_1$ ) e a concentração de sacarose ( $X_2$ ) na produção de levana por *B. subtilis* NATTO

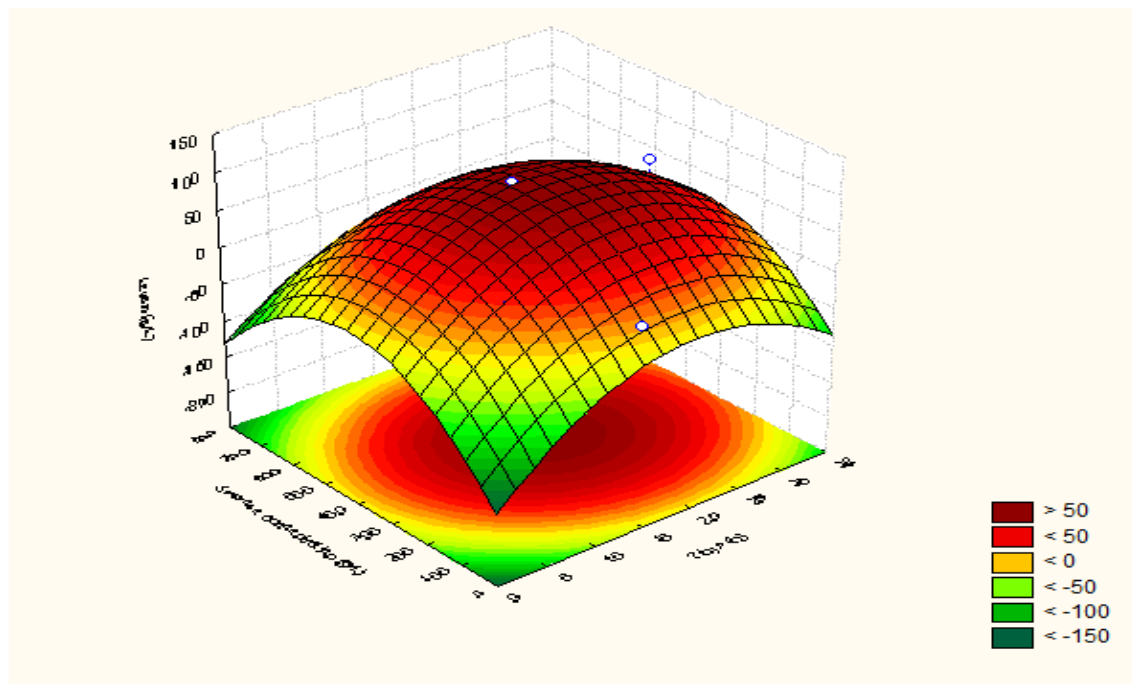
| (*)<br>Ensaio | Variáveis                 |                                    | (Y)<br>Levana<br>(g/L) |
|---------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------|
|               | ( $X_1$ )<br>Tempo<br>(h) | ( $X_2$ )<br>Concentração<br>(g/L) |                        |
| 1             | 12                        | 100                                | 12,93                  |
| 2             | 24                        | 100                                | 8,7                    |
| 3             | 36                        | 100                                | 34                     |
| 4             | 12                        | 200                                | 50,16                  |
| 5             | 24                        | 200                                | 35,24                  |
| 6             | 36                        | 200                                | 7,79                   |
| 7             | 12                        | 300                                | 73,79                  |
| 8             | 24                        | 300                                | 82,02                  |
| 9             | 36                        | 300                                | 76,69                  |

A análise dos efeitos para o primeiro planejamento fatorial (Tabela 2) demonstrou que a sacarose (X2) teve efeito linear positivo na produção de levana, com uma significância ( $p=0,035$ ). Estes resultados indicaram que, para se maximizar a produção de levana, deve-se aumentar a concentração de sacarose.

**Tabela 2** – Análise de variância (ANOVA) e o efeito da concentração de sacarose (X<sub>1</sub>) e tempo de fermentação (X<sub>2</sub>) na produção de levana por *B. subtilis* NATTO

| Fator  | Efeito       | p            |
|--------|--------------|--------------|
| X1 (L) | -6,13        | 0,73         |
| X1 (Q) | 1,11         | 0,97         |
| X2 (L) | <b>58,98</b> | <b>0,035</b> |
| X2 (Q) | 33,94        | 0,31         |
| X1X2   | -9,09        | 0,68         |

Com base nestes resultados, foi realizado o caminho de máxima inclinação ascendente (steepest ascent) com o objetivo de localizar a região de máxima produção de levana e os resultados estão da Tabela 3 e a superfície obtida na Figura 1.



**Figura 1** – Superfície de resposta mostrando os efeitos do tempo (h) e concentração de sacarose (g/L) na produção de levana por *B. subtilis* NATTO.

**Tabela 3** – Delineamento central composto e estrela para avaliar a produção de levana (g/L) por *B. subtilis* NATTO

| (*)<br>Ensaio | Variáveis<br>codificadas |      | Variáveis Originais |                       | Levana (g/L) |
|---------------|--------------------------|------|---------------------|-----------------------|--------------|
|               | X1                       | X2   | Tempo<br>(h)        | Concentração<br>(g/L) |              |
| 1             | -1                       | -1   | 8                   | 200                   | 17,41        |
| 2             | -1                       | 1    | 8                   | 600                   | 13,7         |
| 3             | 1                        | -1   | 24                  | 200                   | 40           |
| 4             | 1                        | 1    | 24                  | 600                   | 23           |
| 5             | -1,8                     | 0    | 1`36``              | 400                   | 4,96         |
| 6             | 1,8                      | 0    | 30`24``             | 400                   | 80,2         |
| 7             | 0                        | -1,8 | 16                  | 40                    | 7,8          |
| 8             | 0                        | 1,8  | 16                  | 760                   | 7,6          |
| 9 (C)         | 0                        | 0    | 16                  | 400                   | 112,09       |
| 10 (C)        | 0                        | 0    | 16                  | 400                   | 111,1        |

A análise dos efeitos do segundo planejamento fatorial revelou que os resultados obtidos estão praticamente no máximo já que o termo linear referente à concentração de sacarose não foi significativa ( $p=0,83$ ) e o termo quadrático significativo ( $p=0,025$ ). O valor de  $R^2$  ajustado foi considerado aceitável ( $p=0,80$ ) e a falta de ajuste do modelo mostrou-se não significativa ( $p=0,55$ ). A escolha conveniente da amplitude da variação ( $\alpha = \pm 1,8$ ) foi necessária para garantir a ortogonalidade dos blocos.

A condição ótima para a produção de levana, a partir de *B. subtilis*, foi obtida utilizando-se 400 g/L de sacarose com 16 h de tempo de cultivo; com uma produção média de 111,6 g/L (Tabela 2). Shih et al. (2005) encontraram que 200 g/L de sacarose produziram de 40-50 g/L de levana do *B. subtilis* isolado do natto; o que foi similar se relativamente comparado à concentração de sacarose utilizada neste estudo.

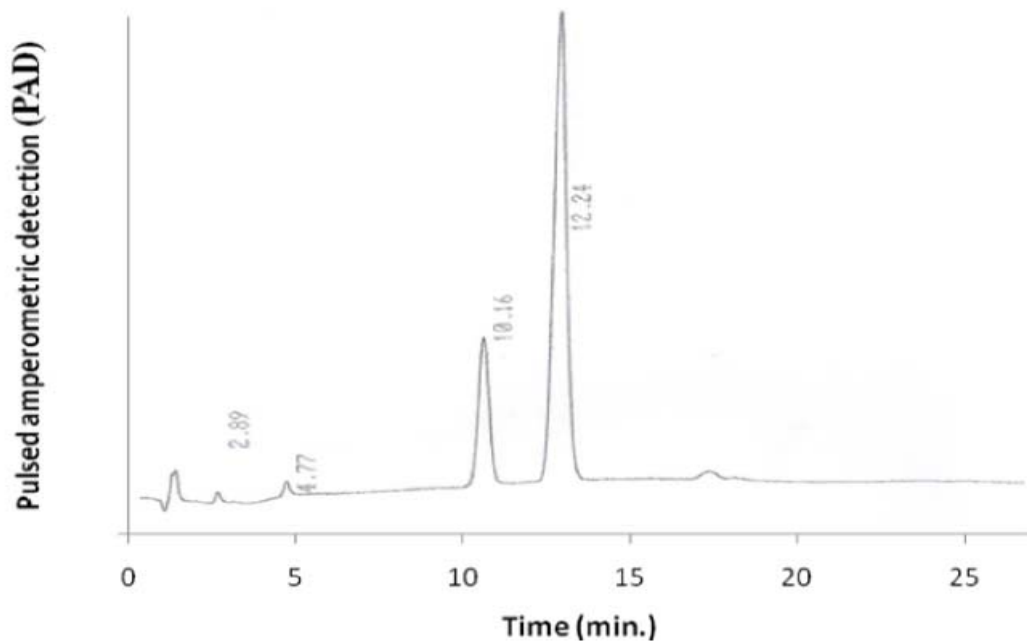
Oliveira et al. (2007) realizaram um planejamento fatorial para a produção de levana, a partir de *Zymomonas mobilis*, utilizando fontes de carboidrato de baixo custo e regionais. Um dos planejamentos fatoriais realizados foi a avaliação da variável dependente (rendimento de levana) com as mesmas variáveis utilizadas neste trabalho; concentração de sacarose e tempo de cultivo. Os autores

conseguiram 21,7 g/L de levana na condição otimizada; 250 g/L de sacarose em 24 h de cultivo.

Abdel-Fattah et al. (2005) afirmaram que concentrações de açúcar, acima de 10%, podem criar problemas na cultura devido à alta viscosidade produzida pelo polímero. Porém o uso de sacarose a 40% pelo *B. subtilis* NATTO, neste estudo, não impediu que a cultura se desenvolvesse e ocorresse uma alta produção de levana.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA DE *B. SUBTILIS* NATTO POR HPAEC

Os cromatogramas obtidos da levana hidrolisada do *B. subtilis* NATTO apresentaram respectivamente picos de glucose (21%) e frutose (79%) (Figura 2). Estes resultados corroboram com Bekers et al. (2005) que também encontraram monômeros de glucose e frutose em todas as levanas testadas após hidrólise com ácido clorídrico quanto com ácidos orgânicos (lático, acético e glucônico). Abdel-Fattah et al. (2005) verificaram a presença de frutose e fruto-oligossacarídeos nos hidrolisados de levana. Estes oligossacarídeos eram constituídos basicamente de frutose; com quantidades pequenas de glucose. Shih et al. (2005) encontraram altas quantidades de frutose quando a levana havia sido hidrolisada com ácido oxálico 0,5%. Tais estudos, que abordam a hidrólise da levana, indicam como possíveis produtos da hidrólise tanto monossacarídeos de glucose e frutose; como fruto-oligossacarídeos apresentado frutose e glucose em sua composição. Os produtos dependerão do lugar de clivagem, durante hidrólise, na cadeia de levana; além de outras variáveis que precisam ser estudadas mais profundamente como o tipo de ácido usado e grau de ramificação da levana produzida.



**Figura 2** – Análise dos hidrolisados de levana de *B. subtilis* NATTO por cromatografia líquida de alta pressão em coluna de troca aniônica (HPAEC).

### 3.3 ESTIMATIVA DA MASSA MOLAR DA LEVANA POR CROMATOLOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

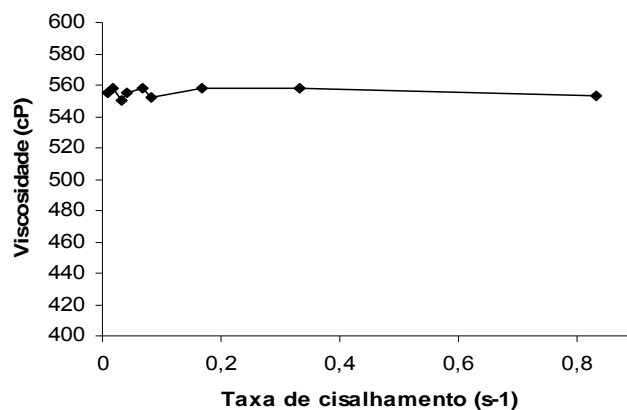
A levana obtida na melhor condição de fermentação, determinada pelo delineamento fatorial e metodologia de superfície de resposta, foi precipitada, liofilizada e submetida à cromatografia de permeação em gel. A amostra apresentou levanas de duas massas molares, aproximadamente 568 K Da e < 50 K Da; nas quantidades 13,39 e 86,61% respectivamente. Tais resultados sugerem que a natureza polimérica de grande parte do material formado era composta principalmente de levana de baixa massa molar ou fruto-oligossacarídeos. Abdel-Fattah et al. (2005) estudaram a síntese enzimática de levana e fruto-oligossacarídeos a partir do *Bacillus subtilis* NRC 33a. Assim como neste estudo, a levana de maior massa molar encontrada, pelos autores, foi 568 K Da. Porém os autores apenas conseguiram produzir levana, nesta faixa de peso molecular, quando aumentaram a concentração da levanasacarase, no processo de produção de levana, de 5 para 1000 µg/mL. De acordo com tais observações, sugere-se que a levana de baixa massa molar, e demais fruto-oligossacarídeos, obtidos neste trabalho, foi produzido com 16 horas de fermentação; haja vista o caráter induzível da levanasacarase. Euzenat et al. (1996) afirmaram que o tamanho da cadeia da

levana diminui com o aumento da concentração de sacarose; o que explica a predominância de levana de baixa massa molar nos tempos iniciais de fermentação, devido às altas concentrações de sacarose testada (400 g/L de sacarose).

A partir dessas observações, infere-se que a massa molar da levana está atrelada às suas condições de fermentação e, devido ao caráter dinâmico de alteração constante do meio de cultura durante a fermentação, obtêm-se levana de diferentes massas molares.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE DA LEVANA DE *B. SUBTILIS* NATTO

A levana, obtida do *B. subtilis* Natto, na concentração de 33,1 % em solução aquosa, baseada no peso da levana não liofilizada, foi submetida à avaliação da sua viscosidade. A solução do exopolissacarídeo apresentou no spindle S 1: 546,5 (cP) de viscosidade com aplicação de 50 rpm e 90,0% de torque. Outras viscosidades foram medidas variando-se a taxa de cisalhamento; observando-se leituras que se situaram entre 70-90% de torque entre os spindles S 1 e 2. A Figura 3 mostra os resultados das medidas e conclui-se que a viscosidade (cP) permaneceu praticamente constante durante as diferentes taxas de cisalhamento ( $s^{-1}$ ); apresentando um comportamento Newtoniano (viscosidade independente da taxa de cisalhamento). Estes resultados corroboram com Arvison et al. (2006) que estudaram regimes de concentração de soluções de levana obtida de *Bacillus sp.* Neste estudo, os autores encontraram um comportamento Newtoniano também por volta de 30%.



**Figura 3** – Viscosidade de solução aquosa de levana (33,1%) de *B. subtilis* NATTO a 25°C.

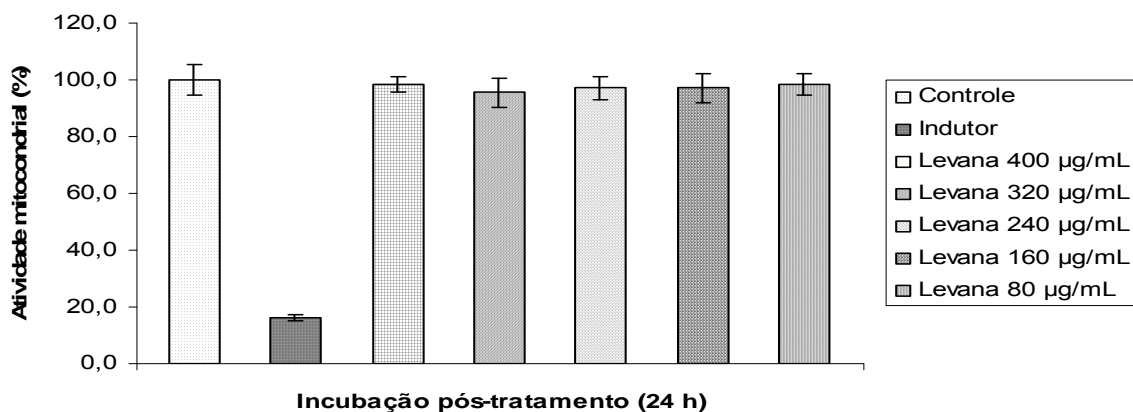


### 3.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

O sal de tetrazolium ou MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) desenvolve um ensaio colorimétrico quantitativo para sobrevivência e proliferação de células de mamíferos; inferindo uma possível citotoxicidade. Segundo Mosmann (1983) e Slater et al. (1963), o anel de tetrazólio, presente no MTT, é clivado por enzimas desidrogenases de mitocôndrias ativas, que somente ocorrem em células vivas de mamíferos, formando cristais de formazana de cor azul escuro intenso. A obtenção de cores azuis menos intensas podem ser indícios da diminuição da sobrevivência e proliferação de células de mamíferos. Os resultados do teste do MTT, para levana do *B. subtilis* NATTO, podem ser vistos na Figura 4; diferentes concentrações de levana foram testadas avaliando-se a atividade mitocondrial.

De acordo com os resultados, nenhum dos tratamentos mostrou-se citotóxico para as células CHO-K1. Estes resultados são comparáveis aos descritos em Kang et al. (2009) que avaliam a citotoxicidade da levana frente linhagens celulares de fibroblastos e queratinócitos humanos. A levana não apresentou citotoxicidade contra estas linhagens celulares incubadas com 100 µg/mL e 1 mg/mL de levana respectivamente. Nestes estudos, os testes de citotoxicidade também foram avaliados por MTT.

Calazans et al. (1997) também avaliaram a toxicidade *in vivo* da levana produzida por cepas de *Zymomonas mobilis*. Nenhuma mortalidade ou efeito adverso foram observados pelos pesquisadores após administração intraperitoneal de levana, bem como não foi possível determinar a LD<sub>50</sub>.



**Figura 4** – Citotoxicidade das células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) frente a diversos tratamentos de levana seguido por 24 h de incubação.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE: MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE

Segundo Coutand et al. (2009) e Bonassi et al. (2007), os micronúcleos são pequenos corpos de DNA localizados no citoplasma. São resultados de fragmentos acêntricos (originado de quebras isocromatídicas ou cromatídicas do cromossomo) ou de disfunções no fuso mitótico. Estes danos genéticos podem sugerir um potencial mutagênico da substância teste dada a sua genotoxicidade, bem como se encontram entre os múltiplos passos da carcinogênese pois são responsáveis pela ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores tumorais. Os resultados de mutagenicidade, para levana do *B. subtilis* NATTO, estão apresentados na tabela 4.

**Tabela 4** – Avaliação da mutagenicidade da levana, produzida por *B. subtilis* NATTO, em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1)

| Tratamentos        | Número de células binucleadas analisadas | Freqüência de micronúcleos (%) |
|--------------------|--|--------------------------------|
| Controle           | 1000                                     | 1,0 %                          |
| MMS                | 1000                                     | 5,7 %                          |
| Levana 200,0 µg/mL | 1000                                     | 0,9 %                          |
| Levana 1,2 mg/mL   | 1000                                     | 0,9 %                          |
| Levana 2,0 mg/mL   | 1000                                     | 0,9 %                          |

Controle (PBS pH 7,4); Indutor - MMS – metilmetanosulfonato  $2.10^{-4}$  M

De acordo com os resultados, nenhum tratamento com levana aumentou a freqüência de micronúcleos para células CHO-K1 quando comparado com o controle; não apresentando potencial mutagênico. Assim estes resultados confirmam que a levana é segura do ponto de vista toxicológico e mutagênico, podendo ser utilizada como aditivo alimentar; o que já vem ocorrendo no Japão (Kang et al., 2009).

Estudos revisados demonstraram apenas a atividade antimutagênica da levana; não sendo mencionada sua capacidade em gerar câncer. Yoon et al. (2004) avaliaram a atividade antimutagênica da levana, produzida pela *Microbacterium laevaniformans* KCTC 9732, em diversos tipos de carcinomas; dentre eles o hepático, ovariano e o colo retal. Resultado semelhante foi encontrado

por Yoo et al. (2004) que avaliaram a atividade antitumoral da levana, produzida pelo *Zymomonas mobilis*, *Rahnella aquatilis* e *Microbacterium laevaniformans*, também sobre diversos tipos de carcinomas.

A produção de exopolissacarídeos com diversas aplicações tecnológicas e clínicas, em especial a levana de *B. subtilis* NATTO, apresenta-se como desafio à comunidade acadêmica que objetivam a obtenção de processos biotecnológicos com altos rendimentos de produção. Pelos resultados apresentados podem-se verificar a alta e promissora capacidade do *B. subtilis* NATTO em produzir levana; permitindo que pesquisas, para sua aplicação industrial, sejam viabilizadas por processos biotecnológicos eficientes.

## 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., Pomgsawasdi, 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.
- Arvidson, S. A., Rinehart, B. T., Gadala-Maria, F, 2006. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydrate Polymers*. 65, 144–149.
- Bae, I. Y., Oh, I. K., Lee, S., Yoo, S. H., Lee, H. G., 2008. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 42, 10–13.
- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, A., Linde, R., 2005. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*. 40, 1535-1539.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M. R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 28(3), 625–631.
- 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 (1), 19–21.
- Calazans, G. M. T, Lima, R.C., França, F. P., Lopes, C. E., 2000. Molecular weight and antimour activity of *Zymomonas mobiles* levans. *Biological Macromolecules*. 27, 245-247.
- Coutand, M., Deydier, E., Cyr, M., Mouchet, F., Gauthier, L., Guilet, R., Bernues Savaete, L., Cren, S., Clastres, P., 2009. Evaluation of laboratory and industrial meat and bone meal combustion residue as cadmium immobilizing material for remediation of polluted aqueous solutions: “*Chemical and ecotoxicological studies*”. *Journal of Hazardous Materials*. 166, 945-953.
- Duboc, P., Mollet, B., 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 11, 759–768.
- Euzenat, O., Guilbert, A., Combes, D., 1996. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*. 32 (3), 237-243.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 455, 81–95.

Kang, S. A., Jang, K. H., Seo, J. W., Kim, K. H., Kim, Y. H., Rairakhwada, D., Seo, M. Y., Lee, J. O., Ha, S. D., Kim, C. H., Rhee, S. K. Levan: Applications and Perspectives. In: Rehm, B. H. A.;2009. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors. Horizon Scientific Press, cap.6, 152,155.

Menoli, R.C.R.N.M., Mantovani, M. S., Ribeiro, L. R., Speit, G., Jordão, B. Q., 2001. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. Mutation Research.496, 5–13.

Miranda, C.C.B.O., Dekker, R. F. H., Serpeloni, J. M., Fonseca, E. A. I., Cólus, I. M. S., Barbosa, A. M., 2008. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. International Journal of Biological Macromolecules.42, 172–177.

Moore, S., Stein, W. H., 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. The journal of Biological Chemistry. 176, 367-388.

Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Applicatoin to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Journal of Immunological Methods.65, 55-63.

Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. Biochemistry.84, 375-380.

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.

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.

Slater, T. F., Sawyer, B., Strauli, U., 1963. Studies on succinate tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. Biochemistry Biophysics Acta.77, 383-393.

Somogy, M., 1952. A new reagent for determination of sugar. Journal Biology Chemistry.160, 61-68.

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.

**ARTIGO B – LEVANA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVO MATERIAL  
POLIMÉRICO: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE, HIDRATAÇÃO E ANÁLISES  
TÉRMICAS EM FILMES ISOLADOS DE EUDRAGIT FS30D®**

**Leandro F. dos SANTOS\*, Edgardo A. G. PINEDA, Maria Antonia P. C.  
CELLIGOI, Osvaldo A. CAVALCANTI**

## LEVANA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVO MATERIAL POLIMÉRICO: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE, HIDRATAÇÃO E ANÁLISES TÉRMICAS EM FILMES ISOLADOS DE EUDRAGIT FS30D®

Leandro F. dos SANTOS<sup>1\*</sup>, Edgardo A. G. PINEDA<sup>2</sup>, Maria Antonia P. C.  
CELLIGOI<sup>1</sup>, Osvaldo A. CAVALCANTI<sup>3</sup>

### Resumo

A levana é um polissacarídeo extracelular constituída predominantemente por resíduos de D-frutose, unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -(2→6); apresentando-se como prebiótico. Filmes cólon-específicos, a base de Eudragit FS 30D, podem ter maior controle na liberação do ativo quando aditivados de um prebiótico; melhorando a terapêutica de patologias colônicas. Este trabalho teve o objetivo de apresentar a levana como candidata na elaboração de um novo material polimérico conjuntamente com o Eudragit FS 30D®. Filmes de Eudragit FS 30D, aditivados com levana, foram confeccionados por “casting process” e em seguidas caracterizados quanto à permeabilidade, hidratação, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TGA). A levana aumentou a permeabilidade dos filmes ( $p < 0,001$ ) entretanto não influenciou no índice de intumescimento das formulações; apresentando  $p > 0,05$ . As análises térmicas dos filmes indicaram a temperatura de transição vítrea aproximada de 47°C e decomposição em torno de 400°C. Os resultados deste estudo indicaram que o exopolissacarídeo levana, produzido pelo *B. subtilis* (NATTO), quando incorporado ao Eudragit FS 30D® na formação de filmes isolados, forneceu subsídios iniciais promissores quanto à perspectiva de aplicação deste novo material no desenvolvimento de sistema voltado à liberação cólon-específica.

**Palavras-chave:** Levana. Filmes poliméricos. Liberação modificada. Eudragit FS 30D.

### INTRODUÇÃO

Nesta última década inúmeras patologias oriundas do padrão de vida moderno, especialmente aquelas provenientes da alimentação industrializada,

---

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, SC 86051-990 Londrina, Brasil. Autor para correspondência: leandrofreire@onda.com.br

<sup>2</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, SC 87020-900 Maringá, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Farmácia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, SC 87020-900 Maringá, Brasil

têm ganhado interesse na pesquisa médica e farmacêutica. Estas doenças têm fortemente acometido o segmento distal do trato gastrointestinal, o cólon. Dentre estas patologias, destacam-se a síndrome do intestino irritável, câncer cólon-retal, doença de Crohn e colite ulcerativa (Jain et al., 2007; Friend, 2005). Polímeros têm sido desenvolvidos para o revestimento de comprimidos ou cápsulas objetivando a liberação do fármaco especificamente neste local de ação.

Dentre os polímeros desenvolvidos está o Eudragit FS30D<sup>®</sup> que é um copolímero aniônico composto de metil acrilato, metilmetacrilato e ácido metacrílico que apresenta propriedades de dissolução em ambiente ligeiramente neutro (pH= 6,8) o que é encontrado no intestino grosso (Beckert, 2000). Esse polímero tem sido aplicado em sistemas de revestimentos farmacêuticos destinados à via oral, e constitui importante estratégia para a liberação cólon-específica, fundamentada nas variações de pH que o trato gastrointestinal possui em condições fisiológicas normais (Beckert, 2000; Gupta et al., 2001).

Adicionar mecanismos adicionais, além da pH-dependência, poderia diminuir as falhas destes sistemas cólon-específicos; haja vista que certas patologias como a colite ulcerativa podem tornar o cólon mais ácido (Gupta et al., 2001; Nungent et al., 2001).

A enzima - especificidade é um dos possíveis mecanismos a serem convergidos para os filmes cólon-específicos; esta especificidade é dada por uma microflora colônica única, complexa, anaeróbica e produtora de enzimas glucosidases (Vardakou et al., 2007). A susceptibilidade enzimática, que certos substratos possuem frente à microflora única do cólon, oferece imensuráveis expectativas de associação, num único sistema, de mecanismos enzima e pH-dependente (Quintanilha et al., 2007; Akhgari et al., 2006).

Dentre os atuais substratos, com potencial para convergir a enzima-especificidade para um revestimento cólon-específico, estão os polissacarídeos microbianos extracelulares (EPS). Estes EPS apresentam-se como potenciais alternativas aos polissacarídeos vegetais tradicionalmente utilizados na aditivação de filmes cólon-específicos, haja vista o alto rendimento e a fácil bioseparação que apresentam aos processos extrativos vegetais (Oliveira et al., 2007). Os EPS são produzidos por diferentes microrganismos e são conhecidos pelo seu efeito prebiótico; onde sofrem degradação enzimática pela microflora colônica (Rastall et al., 2002).



A levana, exopolissacarídeo constituída predominantemente por resíduos de D-frutose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6); podendo ainda apresentar pontos de ramificações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) e um resíduo de glucose terminal (Paula et al., 2008), apresenta-se como candidata à aditivação de filmes cólon específicos dada ao seu efeito prebiótico.

A liberação controlada do fármaco no cólon oferece ao paciente um melhor gerenciamento na liberação do medicamento; melhorando a resposta terapêutica de substâncias farmacologicamente ativas, bem como a redução dos seus efeitos adversos (Oliveira e Cavalcanti, 2007).

Outras substâncias, além dos fármacos utilizados no tratamento de doenças colônicas, se beneficiarão da liberação cólon-específica como o hormônio do crescimento, insulina, endorfinas e calcitonina. Estas substâncias não suportam o ambiente inóspito das regiões proximais do trato gastrointestinal; estômago e intestino delgado fazendo do cólon um local ideal para sua absorção (Katsuma et al., 2006).

Sendo assim, a levana de *B. subtilis* NATTO que apresenta susceptibilidade às enzimas da flora colônica se torna uma candidata na elaboração de um novo material polimérico, conjuntamente com o Eudragit FS 30D<sup>®</sup>, para o desenvolvimento de um sistema enzima e pH-dependente para liberação de substâncias farmacologicamente ativas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Materials***

Eudragit FS30D<sup>®</sup> (copolímero aniônico composto de metil acrilato, metilmetacrilato e ácido metacrílico, Evonik Industries<sup>®</sup>, Pharma Polymers, São Paulo, Brasil) e levana obtida do *B. subtilis* isolado no alimento japonês Natto (Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, Brasil). Todos os demais materiais utilizados nos ensaios foram de grau analítico.

### ***Produção da levana***

As fermentações, para obtenção da levana do *B. subtilis* (NATTO), foram realizadas em erlenmeyers de 2L com volume de trabalho de 500 mL nas seguintes condições: 16 h, 37°C e 150 rpm no seguinte meio em g/L; sacarose 400,0; extrato de levedura 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,06; MnSO<sub>4</sub> 0,02 e água destilada.

### ***Preparação dos filmes***

Os filmes foram obtidos a partir de dispersões poliméricas de base aquosa preparadas em quatro diferentes concentrações, fazendo variar a concentração do pseudolátex e/ou da levana, permanecendo sempre a massa polimérica final de 4% (p/v) (Bunhak et al., 2007). As proporções testadas foram 100:0 (Eudragit FS30D<sup>®</sup>: Levana), 95:05, 90:10 e 80:20. Foi utilizado ainda, como agente deslizante, uma dispersão de 5% de monoestearato de glicerila (MEG) e 2% de tween 80 (Ibekwe et al., 2006). As dispersões contendo inicialmente o Eudragit FS30D<sup>®</sup> acrescidas do agente deslizante foram deixadas sob agitação por um período de 30 minutos a 25 ± 2,0 °C. Após completa homogeneização, foram adicionadas as soluções de levana (5, 10 e 20% respectivamente), as quais foram deixadas sob agitação por mais 60 min a 25 ± 2,0 °C. Durante todo o processo de homogeneização foi utilizada bomba a vácuo visando evitar a incorporação de ar e formação de bolhas às misturas poliméricas. 10 mL das diferentes associações foram vertidas sobre moldes de teflon<sup>®</sup>, previamente demarcados e fixados numa placa de nylon com uma área de 28,27 cm<sup>2</sup>, devidamente nivelada e levada ao aquecimento em estufa a 50 °C por 24 h; condições de tempo e temperatura mínima para a formação de filmes isolados adotados nesta investigação. Em seguida, foi realizada análise macroscópica dos filmes buscando selecionar amostras dos materiais com ausência de rachaduras, bolhas de ar ou quaisquer imperfeições que pudessem interferir nos ensaios. Concomitantemente, foi realizada a determinação das espessuras dos filmes isolados (5 amostras para cada formulação) usando micrômetro (Mitutoyo<sup>®</sup>) com sensibilidade de 0,01 mm em cinco pontos aleatórios da superfície. As membranas selecionadas foram acondicionadas em dissecador até o momento de realizar os testes posteriores (Cavalcanti et al., 2002).

### **Determinação da transmissão de vapor d'água**

O estudo de transmissão de vapor d'água (TVA) foi desenvolvido em conformidade com método "B" da ASTM (*American Society for Testing and Materials*) designado E96-66. Inicialmente, no interior de cada cúpula de permeabilidade (modelo *Payne permeability cup*, Bélgica) foram adicionados 10,0 mL de água destilada. Em seguida, os filmes candidatos à investigação, com área de 9,62 cm<sup>2</sup>, foram fixados às cúpulas individualmente. O conjunto (cúpula + água destilada + amostra filme) foi pesado no tempo zero e armazenado em dissecador contendo sílica-gel. As cúpulas, em triplicata, para cada filme, foram pesadas nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h. A cada intervalo de tempo pré-estabelecido, a sílica-gel era trocada por outra desidratada (50 °C/24 h). A diferença de massa das cúpulas em cada intervalo de tempo foi registrada e aplicada na Equação [1] para calcular a taxa de transmissão de vapor d'água através dos filmes isolados.

$$TVA = \frac{g \times 24}{t \times a} \quad (1)$$

Onde,  $g$  é a perda de massa em gramas,  $t$  é tempo em  $h$  e  $a$  a área do filme em m<sup>2</sup>.

### **Determinação do índice de intumescimento**

Os filmes das diferentes associações foram minuciosamente cortados com tesoura cirúrgica (modelo Professional F/1) em aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup>, sendo em seguida distribuídos no interior de placas de Petri devidamente identificadas. Posteriormente, as placas de Petri foram colocadas em estufa a 50 °C, por aproximadamente 24 h, atingindo massa constante. Após este tempo, as placas foram retiradas e mantidas em dissecadores durante a realização do experimento. Amostras dos filmes secos representantes das diferentes composições foram pesadas em balança analítica, e imediatamente imersas em recipiente por diferentes intervalos de tempo à temperatura ambiente, contendo Fluido de Simulação Gástrica (FSG) preparado conforme a 23<sup>a</sup> ed. Farmacopéia dos Estados Unidos da América, sem a presença de enzimas. Em cada intervalo de tempo pré-estabelecido às

amostras (em triplicata) foram removidas dos meios com auxílio de pinça e cuidadosamente enxugadas, entre duas folhas de papel de filtro, e repesadas retirando o excesso de líquido. Foram retiradas amostras nos intervalos de 1, 10, 30, 60, 75, 90, 105 e 120 min de imersão. Para o cálculo do índice de intumescimento (Ii%) foi utilizada a Equação [2] (Blanchon et al., 1991) a seguir:

$$Ii\% = \frac{P_i - P_s}{P_s} \times 100 \quad (2)$$

Onde  $P_i$  é o peso do filme intumescido, no tempo correspondente, e  $P_s$  é o peso do filme seco.

### ***Calorimetria diferencial de varredura***

A calorimetria diferencial de varredura foi realizada utilizando-se 6 mg das diferentes associações com um calorímetro Netzch DSC-204 em uma atmosfera com fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. As amostras foram aprisionadas em cadinho de alumínio com tampa furada e submetidas a um programa de aquecimento controlado; 0-600°C a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto. Antes disso foi aplicada uma isoterma de 100°C por 15 min objetivando a perda total de umidade. A diferença de fluxo de calor da amostra e do padrão foi controlada, verificando-se a perda ou ganho de energia da amostra pela variação da entalpia esboçada em gráficos por picos endotérmicos e exotérmicos (Cavalcanti et al., 2004).

### ***Análise termogravimétrica***

Foram conduzidos experimentos para investigar a estabilidade térmica, por termogravimetria, das diferentes associações candidatas, utilizando-se um aparelho Netzsch TGA-204. Foram utilizadas aproximadamente 10 mg de amostra em uma atmosfera de fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. A faixa de temperatura foi de 0-600°C a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto (Cavalcanti et al., 2004).

### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram usadas para determinar o nível de significância existente entre os valores obtidos em todos os ensaios envolvendo os filmes. Estas análises foram realizadas com ajuda do programa *GraphPad Prism*<sup>®</sup> (versão 2.01, 1996). Os diferentes resultados referentes aos coeficientes de li% e TVA, obtidos em FSG, foram inicialmente avaliados usando análise de variância (ANOVA), sendo os resultados considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Quando o conjunto desses valores forneceu parâmetros significativos, foi realizada aplicação das médias dos dados obtidos no teste de múltipla comparação de Tukey, visando comparar o papel das diferentes composições poliméricas. Também sendo considerados significativos os valores registrados para  $p < 0,05$  (Cavalcanti et al., 2002; Cavalcanti et al., 2004).

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### ***Caracterização Morfológica Macroscópica e determinação da espessura dos filmes***

A caracterização morfológica macroscópica dos filmes, bem como a determinação da sua espessura, são etapas críticas para se garantir a reprodutibilidade dos ensaios propostos (Oliveira e Cavalcanti, 2007; Cavalcanti et al., 2002).

Os filmes obtidos por evaporação (casting process) em placas de Teflon<sup>®</sup>, a partir de dispersões poliméricas de base aquosa, não apresentaram rachaduras ou bolhas de ar, bem como não apresentaram evidências de incompatibilidades entre o polímero sintético Eudragit FS30D<sup>®</sup> e a levana.

A compatibilidade que certos polissacarídeos possuem, frente à polímeros polimetacrilatados, são amplamente divulgados pela literatura científica. Oliveira e Cavalcanti (2007) verificaram que não houve incompatibilidades entre  $\alpha$ -gluco-oligossacarídeo e o polímero polimetacrilatado utilizado. Cavalcanti et al. (2002) avaliaram a permeabilidade e hidratação de filmes polimetacrilatados aditivados com o polissacarídeo inulina. Não houve incompatibilidades entre os polímeros polimetacrilatados e a inulina; quimicamente muito semelhante à levana

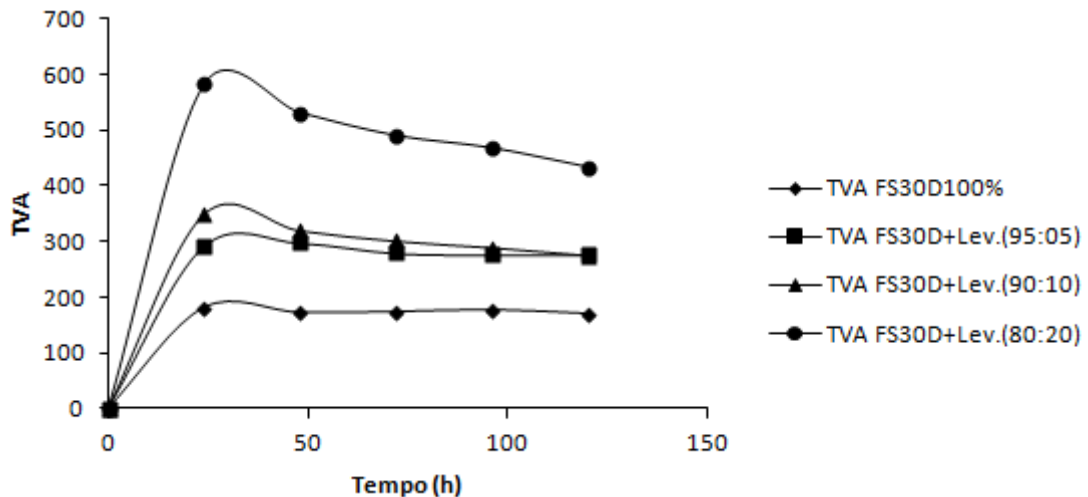
(Jain et al., 2007). Pelos resultados é possível sugerir que a levana não apresenta incompatibilidade com o polímero polimetacrilatado Eudragit FS30D; reforçando a sua aplicabilidade em filmes isolados.

Os filmes obtidos, com a adição de levana, apresentaram homogeneidade na espessura entre as várias formulações testadas ( $p=0,114$ ). Entretanto, o aumento da concentração da levana diminuiu a transparência e a flexibilidade dos filmes isolados. Bunhak et al. (2007) também obtiveram diminuição da flexibilidade e transparência conforme aumento do sulfato de condroitina nos seus filmes polimetacrilatados; embora neste caso a flexibilidade e transparência ainda permaneceram adequadas.

### ***Transmissão de vapor d`água***

A transmissão de vapor d`água (TVA) avalia a hidrofília dos polímeros presentes nos filmes, bem como oferece um índice na qual é possível relacionar a mobilidade da matriz polimérica frente às moléculas de vapor de água (MONDAL e YONG, 2006). Os resultados revelam que a levana alterou a permeabilidade dos filmes. O ensaio de TVA, para os filmes Eudragit FS30D<sup>®</sup> (EF) e levana (L), pode ser visto na Figura 1. A levana aumentou a permeabilidade dos filmes ( $p<0,001$ ), embora não haja diferença estatística entre as formulações EFL 95:05 e EFL 90:10 ( $p=0,069$ ); e sim uma leve tendência de TVA maior no EFL 90:10. O índice de TVA foi aumentado consideravelmente na formulação EFL 80:20 ( $p<0,001$ ).

Estes resultados são semelhantes aos de Bunhak et. al (2007) que analisaram a transmissão de vapor de água de filmes isolados polimetacrilatados aditivados com o polissacarídeo sulfato de condroitina. Os autores encontraram que o aumento da concentração do polissacarídeo gerou aumento proporcional na taxa de transmissão de vapor d`água; fenômeno que pôde ser explicado pelo aumento da hidrofílicidade do sistema, causado pela adição do polissacarídeo. A levana, assim como o sulfato de condroitina, apresenta grande quantidade de grupos funcionais hidroxilas (OH<sup>-</sup>) que são capazes de aumentar a hidrofília do sistema e demonstrar comportamento semelhante. Os índices de TVA foram proporcionais à concentração da levana nos filmes isolados.



**Figura 1** – Transmissão do vapor de água dos filmes nas diferentes associações – Eudragit FS30D e levana (n=3) de *B. subtilis* NATTO.

### **Determinação do Índice de Intumescimento (Ii%)**

O intumescimento permite avaliar a hidrofília dos polímeros constituintes do filme isolado através do seu comportamento de hidratação inferida pelo índice de intumescimento. Segundo Oliveira e Cavalcanti (2007) uma hidrofília moderada, avaliada por intumescimento em fluídos fisiológicos, fornece uma forte expectativa da garantia do acesso ao cólon das bactérias existentes na porção distal do TGI. Neste estudo aplicou-se o índice de intumescimento de filmes isolados polimetacrilatados, aditivados com  $\alpha$ -gluco-oligosacarídeo, para se avaliar a hidrofília do sistema. Os índices de intumescimento, para as formulações EFL, podem ser vistas na Tabela 1. Os desvios padrões foram considerados adequados; haja vista que estudos anteriores apresentaram desvios padrões maiores que o nosso (>20) neste mesmo tipo de metodologia (AKHGARI et al., 2006). O Eudragit FS30D<sup>®</sup>, devido ao seu comportamento pH-dependente, não foi imerso em FSI (BECKERT, 2000).

**Tabela 1** – Índice de intumescimento das formulações EFL em fluido de simulação gástrico (média dos dados  $\pm$  S.D.; n=3)

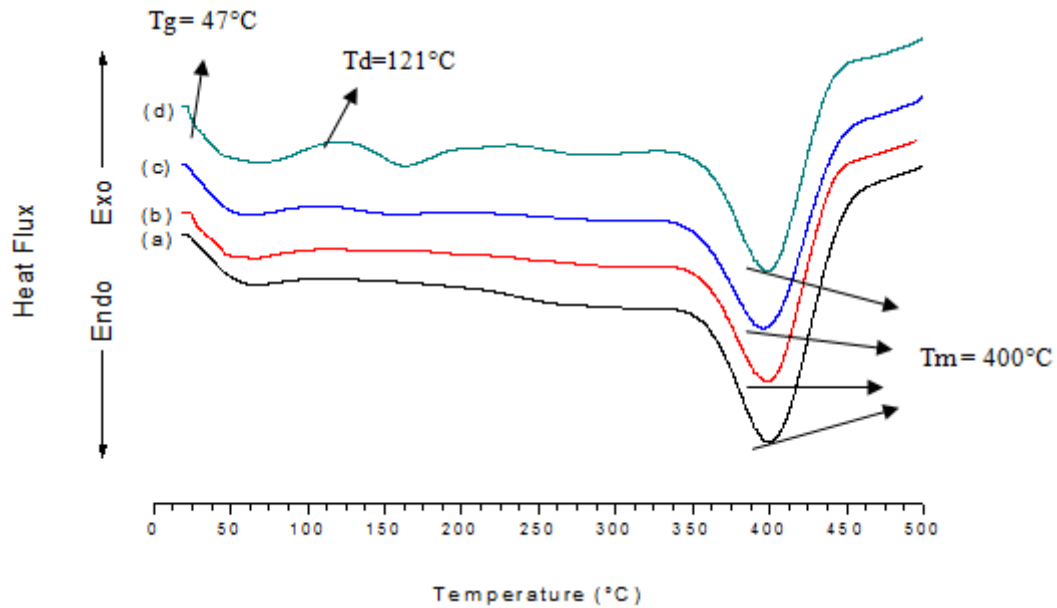
| Formulação | Índice de intumescimento, li (%) |
|------------|----------------------------------|
|            | FSG                              |
| EF 100%    | 33,71 $\pm$ 7,57                 |
| EFL 95:05  | 42,10 $\pm$ 7,81                 |
| EFL 90:10  | 33,05 $\pm$ 3,4                  |
| EFL 80:20  | 32,27 $\pm$ 1,07                 |

Os resultados demonstram que a levana não influenciou no índice de intumescimento das formulações EFL; apresentando  $p > 0,05$ . Estes resultados foram comparáveis com Akhgari et al. (2006). Esses pesquisadores encontraram que a inulina, nas concentrações 10-20-30%, não influenciou o intumescimento de filmes isolados contendo Eudragit FS30D<sup>®</sup>, o mesmo polímero sintético utilizado neste modelo.

### **Análises térmicas**

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) permite a análise do perfil energético das amostras num intervalo específico de temperatura. Estudos costumam evidenciar eventos endotérmicos largos (35°C-160°C) atribuídos à perda de água, bem como eventos endotérmicos referentes à sua fusão; eventos endo e exotérmicos também podem corresponder à decomposição térmica dos produtos (CAVALCANTI et al., 2004). As curvas de DSC, para os filmes a base de Eudragit FS30D<sup>®</sup>, podem ser vistos na Figura 2 respectivamente.





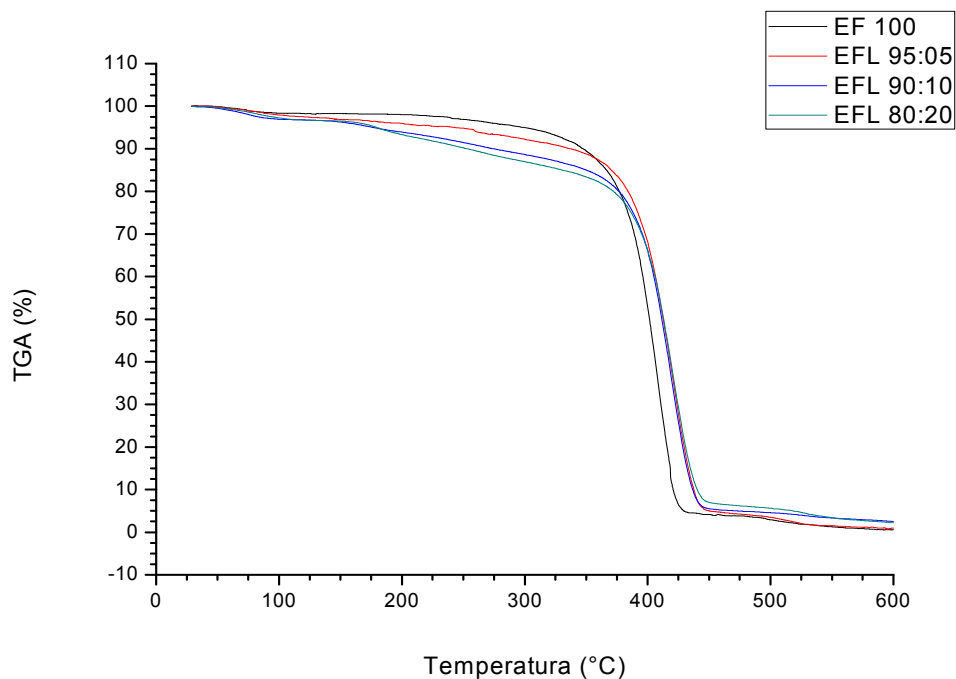
**Figura 2** – Curvas da calorimetria diferencial de varredura das diferentes associações Eudragit FS 30D: Levana a) EF100% b) EFL 95:05 c) EFL 90:10 d) EFL 80:20

Os resultados, das curvas de DSC para EFL, indicaram apenas uma temperatura de transição vítrea ( $t_{g\text{máx}} \sim 47^\circ\text{C}$ ) indicando compatibilidade entre os materiais, bem como a miscibilidade da mistura polimérica em todas as formulações. Esses resultados são compatíveis com as especificações da Evonik Industries que indicaram, como  $t_g$  do Eudragit FS30D, a temperatura aproximada de  $48^\circ\text{C}$ . Também não houve diferenças significativas entre a formulação controle e as outras formulações aditivadas com levana ( $DP=1,51$ ); inferindo-se que o exopolissacarídeo não influenciou a transição vítrea. Entretanto as formulações EFL 80:20 apresentaram, logo após a transição vítrea, um pico exotérmico referente a uma relaxação ( $t_d=120,6^\circ\text{C}$ ). Segundo Sakamoto et al. (2003) o pico de relaxação, que está associada à temperatura de transição, é devida a uma movimentação das cadeias poliméricas ocasionando uma assimetria na distribuição de cargas eletrônicas em torno de suas moléculas; ou devido ainda à presença de cargas espaciais.

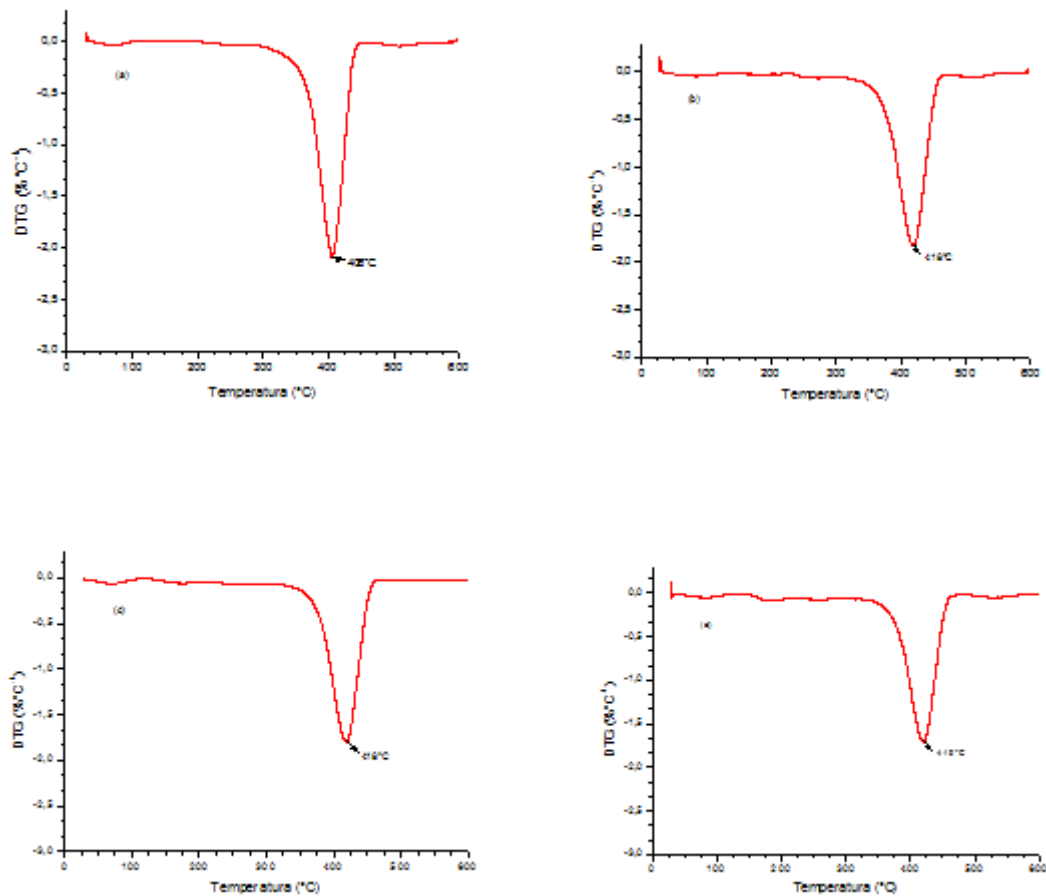
O pico endotérmico da decomposição não foi influenciado pela levana, nas formulações EFL; ficando em torno de  $400^\circ\text{C}$ . Estes resultados estão em similitude com outros estudos. Rabito (2009) analisou por DSC filmes isolados, a base de Eudragit FS30D, aditivados com a arabinóxilana. Os resultados demonstraram que tanto os filmes EF 100%, como em todas as concentrações de

arabinosilanas utilizadas, o pico da decomposição também foi observado em torno de 400°C; o plastificante e a concentração utilizada foram as mesmas.

Os perfis termogravimétricos (TGA) das formulações EFL podem ser vistos na Figura 3. As curvas termogravimétricas derivadas (DTG) podem ser verificadas na Figura 4. As análises termogravimétricas avaliam a estabilidade térmica dos compostos (Cavalcanti et al., 2004). Ainda segundo Cavalcanti et al. (2004), a derivada das curvas de TGA facilita a observação de diferentes estágios de degradação. As curvas de TGA e DTG, para as formulações EFL, indicaram perdas de massa entre 405,9°C e 419,6°C; confirmando altas temperaturas de degradação. Em média, 90,8% da massa foi perdida entre 300 e 450°C. Não foram observadas diferenças significativas na perda de massa, entre as diferentes formulações contendo Eudragit FS30D, para temperaturas de até 100°C (EF 99,43±0,62; EFL95:05 99,33±0,68; EFL90:10 98,77±1,07; EFL80:20 99,06±0,88). A levana aumentou proporcionalmente, conforme participação crescente nas diferentes formulações, a perda de massa entre 100 e 350°C. As formulações, com maiores concentrações de levana, apresentaram menores perdas de massa durante o ensaio; 97,52% e 97,89% para EFL 90:10 e 80:20 respectivamente, e 99,40% e 99,15% para EF e EFL 95:05.



**Figura 6** – Curvas de termogravimetria dos filmes isolados Eudragit FS30D® aditivados com levana de *B. subtilis* NATTO.



**Figura 4** – Curvas termogravimétricas derivadas das diferentes associações de filmes Eudragit FS 30 D: Levana: a) EF 100, b)EFL 95:05, c) EFL 90:10 e d) EFL 80:20.

Estes resultados foram considerados positivos haja vista que o novo material polimérico, aditivado com levana, apresentou altas temperaturas de degradação; bem como a levana não influenciou na estabilidade térmica do material até 100°C.

### **Conclusões**

A aplicação de polissacarídeos, principalmente aqueles produzidos por microrganismos, permanece como grande desafio na área de excipientes farmacêuticos. Os resultados deste estudo indicaram que o exopolissacarídeo levana, produzido pelo *B. subtilis* NATTO, quando incorporado ao Eudragit FS 30D® na formação de filmes isolados, forneceu subsídios iniciais promissores quanto à

perspectiva de aplicação deste novo material no desenvolvimento de sistema voltado à liberação cólon-específica.

A levana e o Eudragit FS 30D foram quimicamente compatíveis; não apresentando separação de fases durante a fabricação do filme. A mobilidade das cadeias poliméricas do Eudragit FS 30 D foi aumentada consideravelmente nas formulações EFL 80:20 pela ação da levana; sendo consideradas moderadas nas formulações EFL 95:05 e EFL 90:10. Os filmes também apresentaram alta estabilidade térmica (até 100°C).

Estes resultados nos permitem sugerir que os filmes isolados produzidos neste trabalho poderão, após estudos complementares, serem utilizados para revestimento de comprimidos ou cápsulas para liberação cólon-específica de fármacos.

## REFERÊNCIAS

- Akhgari A, Farahmand F, Garekani HA, Sadeghi F, Vandamme TF (2006). Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. *European journal of pharmaceutical sciences*. 28:307-314.
- Beckert T (2000). Eudragit® Makes it possible. *Pharma Polymers*. 7:1-3.
- Blanchon S, Couarraze G, Rieg-Falsen F, Cohen G, Puisieux F (1991). Permeability of progesterone and synthetic progestin through methacrylic films. *International Journal of Pharmaceutics*. 72:1-10.
- Bunhak EJ, Mendes ES, Pereira NC, Cavalcanti OA (2007). Influência do Sulfato de Condroitina na Formação de Filmes Isolados de Polimetacrilato. Avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d' água. *Acta Farm. Bonaerense*. 26:89-95.
- Cavalcanti OA, Mooter GVD, Soares IC, kinget R (2002). Polysaccharides as Excipients for Colon-Specific Coatings. Permeability and Swelling Properties of Casted Films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 28:157-164.
- Cavalcanti OA, Petenuci B, Bedin AC, Pineda EAG, Hechenleitner AAW (2004). Characterisation of Ethylcellulose Films containing Natural Polysaccharides by Thermal Analysis and FTIR Spectroscopy Natural Polysaccharides by Thermal Analysis and FTIR Spectroscopy. *Acta Farm. Bonaerense*. 23 : 53-7.
- Friend DR (2005). New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57:247-265.
- Gupta VK, Beckert TE, Price JC (2001). A novel pH- and time-based multi-unit potential colonic drug delivery system. I. Development. *International Journal of Pharmaceutics*. 213:83–91.
- Ibekwe VC, Fadda HM, Parsons GE, Basit AW (2006). A comparative in vitro assessment of the drug release performance of pH-responsive polymers for ileo-colonic delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 308:52-60.
- Jain, A.; Gupta, y.; Jain, s. K (2007). Perspectives of Biodegradable Natural Polysaccharides for Site-Specific Drug Delivery to the Colon. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 10:86-128.
- Katsuma M, Watanabe S, Kawai H, Takemura S, Sako K (2006). Effects of absorption promoters on insulin absorption through colon-targeted delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 307:156–162.
- Mondal, S.; Yong, JLHZ (2006). Free volume and water vapor permeability of dense segmented polyurethane membrane. *Journal of Membrane Science*. 208:427-432.
- Nugent SG, Kumar D, Rampton DS, Evans DF (2001). Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosaliclates and other drugs. *Gut*. 48:571-577.

Oliveira MR, silva RSSF, Buzato JB, Celligoi MAPC (2007). Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal*. 37:177–183.

Oliveira FM, Cavalcanti OA (2007). Pré-Bióticos na Formação de Filmes Isolados de Eudragit® RS 30 D. Avaliação das Propriedades de Intumescimento e Permeabilidade. *Latin American Journal of Pharmacy*. 26:325-33.

Paula VC, Pinheiro IO, Lopes CE, Calazans GMT (2008). Microwave-assisted hydrolysis of *Zymomonas mobilis* levan envisaging oligofructan production. *Bioresource Technology*. 99:2466–2470.

Quintanilha AG, Zilberstein B, Santos MAA, Pajecki D, Moura AGH, Alves PRA, Maluf – Filho F, Cecconello I (2007). A novel sampling method for the investigation of gut microbiota. *World J. Gastroenterol*. 13:3990-3995.

Rastall RA, Maitin V (2002). Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology*. 13:490–496.

Sakamoto WK, Kanda DHF, Andrade FA (2003). Dielectric relaxation of vegetable based polyurethane. *Journal of materials science* 38:1465 – 1470

Vardakou M, Palop CN, Gasson M, Narbad A, Christakopoulos P (2007). In vitro three-stage continuous fermentation of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity by the gut microflora. *International Journal of Biological Macromolecules*. 41:584-589.

**ARTIGO C – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE, HIDRATAÇÃO E ANÁLISES  
TÉRMICAS DE FILMES ISOLADOS DE EUDRAGIT RS 30D<sup>®</sup> ADITIVADOS COM  
LEVANA DE BACILLUS SUBTILIS NATTO. MATERIAL CANDIDATO AO  
REVESTIMENTO FARMACÊUTICO.**

**Leandro F. dos SANTOS<sup>\*</sup>, Edgardo A. G. PINEDA, Maria Antonia P. C.  
CELLIGOI, Osvaldo A. CAVALCANTI**

## **AValiação DA PERMEABILIDADE, HIDRATAÇÃO E ANÁLISES TÉRMICAS DE FILMES ISOLADOS DE EUDRAGIT RS 30D<sup>®</sup> ADITIVADOS COM LEVANA DE BACILLUS SUBTILIS NATTO. MATERIAL CANDIDATO AO REVESTIMENTO FARMACÊUTICO.**

**Leandro F. dos SANTOS<sup>1\*</sup>, Edgardo A. G. PINEDA<sup>2</sup>, Maria Antonia P. C. CELLIGOI<sup>1</sup>,  
Oswaldo A. CAVALCANTI<sup>3</sup>**

### **Resumo**

Membranas metacrilatadas tempo-dependentes, contempladas com a aditivação de prebióticos como a levana, oferecem destacada liberação controlada cólon-específica. Estas novas barreiras, com uma cinética de liberação diferenciada, apresentam combinação de mecanismos tempo e enzimo-dependentes; sendo uma nova alternativa de revestimento para tratamentos de doenças colônicas. Este trabalho teve o objetivo de apresentar a levana, de *B. subtilis* NATTO, como candidata na elaboração de um novo material polimérico conjuntamente com o Eudragit RS 30D<sup>®</sup>. Filmes de Eudragit RS 30D, aditivados com levana, forma confeccionados por “casting process” e em seguida caracterizados quanto à permeabilidade, hidratação, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TGA). As formulações Eudragit RS 30D:Levana (ERL) 95:05 e ERL 80:20 tiveram um aumento da transmissão de vapor d’água (TVA) condizente ao aumento da participação do exopolissacarídeo nos filmes isolados;  $p < 0,001$ . A levana influenciou no índice de intumescimento das formulações ERL 95:05 e 90:10 em fluido de simulação gástrica (FSG); sendo relativamente proporcional a participação do exopolissacarídeo no filme. Em fluido de simulação intestinal (FSI), apenas a formulação ERL 90:10 apresentou significativamente diferente ao controle ( $p < 0,001$ ). Nas formulações ER 100% e ERL 80:20, o intumescimento foi maior em FSI do que em FSG; respectivamente  $p = 0,028$  e  $p = 0,0012$ . Em média, 94,08% da massa foi perdida entre 150°C e 450°C; período de maior degradação térmica. O novo material polimérico apresentou-se promissor para revestimento de fármacos em que se deseja liberação colônica.

**Palavras-chave:** Levana. Filmes poliméricos. Liberação modificada. Eudragit RS 30D.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, SC 86051-990 Londrina, Brasil. \*Autor para correspondência: leandrofreire@onda.com.br

<sup>2</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, SC 87020-900 Maringá, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Farmácia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, SC 87020-900 Maringá, Brasil



## INTRODUÇÃO

Desenvolver “medicamentos inteligentes” que saibam dirigir-se às regiões específicas do organismo, liberando ativo exatamente onde este deverá atuar, evitando distribuição aleatória, aliado a extinção dos longos esquemas posológicos, constitui grande desafio para pesquisadores acadêmicos e industriais.

Dentre as pesquisas envolvendo esses sistemas terapêuticos, destacam-se formulações destinadas à liberação modificada de fármacos as quais oferecem efetivo gerenciamento na disponibilização dos fármacos, seja temporal e/ou espacial. Tais sistemas melhoram a resposta terapêutica de substâncias farmacologicamente ativas, bem como reduzem os seus efeitos adversos (Sinha et al., 2004).

A Biotecnologia tem contribuído neste campo de pesquisa aonde exopolissacarídeos, por exemplo, têm sido aplicados em implantes subcutâneos, matrizes de comprimido e hidrogéis (Pitarresi et al., 2007). Estes exopolissacarídeos são polímeros ou carboidratos amplamente produzidos por diferentes microrganismos com potencial de aplicação não só junto ao mercado industrial farmacêutico, como em diversos segmentos industriais, pois apresentam grande produtividade e são de fácil purificação quando comparados a compostos de origem vegetal (Oliveira et al., 2007).

Embora seja notória a potencial aplicabilidade dos exopolissacarídeos neste contexto, pouco se tem estudado sobre sua inserção direta em dispositivo específico. Filmes poliméricos destinados à aplicação no processo de revestimento de sólidos orais para liberação de fármacos, em geral, apresentam na sua composição polímero pH - dependente ou tempo -dependente, podendo contemplar a presença de substrato vulnerável especificamente pela microflora colônica auxiliando na liberação do fármaco no cólon.

Mecanismo pH ou tempo – dependente aliado ao enzimo-dependente são estratégias que podem auxiliar no tratamento de inúmeras patologias existentes no cólon. Dentre as patologias, que podem se beneficiar pelo uso destes materiais poliméricos, estão a síndrome do intestino irritável, câncer cólon-retal, doença de Crohn e colite ulcerativa (Cavalcanti et al., 2002).

As formulações farmacêuticas disponíveis atualmente para tratamento dessas patologias envolvem sistemas orais pH dependentes ou enemas.

Estes tratamentos tradicionais não são sítio – específicos e podem falhar com alta frequência, prioritariamente devido às variações das condições fisiológicas, aliado a restrição do acesso do fármaco à região lesada.

A levana é um exopolissacarídeo constituído predominantemente por resíduos de D-frutose que apresenta susceptibilidade específica às enzimas do ecossistema colônico e apresenta-se como candidata a aditivção de filmes poliméricos tempo-dependente como o Eudragit RS 30D (De Paula et al., 2008). O presente trabalho teve por objetivo adicionar a levana, polissacarídeo extracelular produzido pelo *B. subtilis* NATTO, na fabricação de filmes poliméricos isolados do Eudragit RS 30D<sup>®</sup>, avaliando a influência da levana na permeabilidade, hidratação e análises térmicas destes filmes.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Materials***

Eudragit RS 30D<sup>®</sup> (copolímero metacrilato de amônio, tipo B, USP/NF/Röm Pharma, Darmstadt - Alemanha) e levana obtida do *B. subtilis* isolado do alimento japonês Natto (Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, Brasil). Todos os demais materiais utilizados nos ensaios foram de grau analítico.

### ***Produção da levana***

As fermentações, para obtenção da levana do *B. subtilis* (NATTO), foram realizadas em erlenmeyers de 2L com volume de trabalho de 500 mL nas seguintes condições: 16 h, 37°C e 150 rpm no seguinte meio em g/L; sacarose 400,0; extrato de levedura 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,06; MnSO<sub>4</sub> 0,02 e água destilada.

### ***Preparação dos filmes***

Os filmes foram obtidos a partir de dispersões poliméricas de base aquosa preparadas em quatro diferentes concentrações, fazendo variar a concentração do pseudolátex e/ou da levana, permanecendo sempre a massa polimérica final de 4% (p/v) (Bunhak et al., 2007). As proporções testadas foram 100:0 (Eudragit RS 30D<sup>®</sup>: Levana), 95:05, 90:10 e 80:20. Para obtenção das películas foi usado o agente plastificante citrato de trietila a 20% (Abbaspour et al., 2008). As dispersões contendo inicialmente o Eudragit RS30D<sup>®</sup> acrescidas do agente plastificante foram deixadas sob agitação por um período de 30 minutos em temperatura ambiente (TA=25°C ± 2,0). Após completa homogeneização, seguindo as proporções citadas anteriormente, foram adicionadas quantidades variáveis da solução de levana (5, 10 e 20% respectivamente), as quais foram deixadas sob agitação por mais 60 min em TA. Durante todo o processo de homogeneização foi utilizada bomba a vácuo visando evitar a incorporação de ar e formação de bolhas às misturas poliméricas. Após completa homogeneização, as diferentes associações foram amostradas e vertidas no volume de 10,0 mL sobre moldes de teflon<sup>®</sup>, previamente demarcados e fixados numa placa de nylon com uma área de 28,27 cm<sup>2</sup>, devidamente nivelada e levada ao aquecimento em estufa a 45 °C por 24 h; condições de tempo e temperatura mínima para a formação de filmes isolados adotados nesta investigação. Transcorridas às 24 h os filmes foram cuidadosamente removidos do substrato. Em seguida, foi realizada análise macroscópica dos filmes buscando selecionar amostras dos materiais com ausência de rachaduras, bolhas de ar ou quaisquer imperfeições que pudessem interferir nos ensaios propostos. Concomitantemente, foi realizada a determinação das espessuras dos filmes isolados (5 amostras para cada formulação) usando micrômetro (Mitutoyo<sup>®</sup>) com sensibilidade de 0,01 mm em cinco pontos aleatórios da superfície. As membranas selecionadas foram acondicionadas em dissecador até o momento de realizar os testes posteriores (Cavalcanti et al., 2002).

### ***Determinação da transmissão de vapor d'água (TVA)***

O estudo de TVA foi desenvolvido em conformidade com método "B" da ASTM (*American Society for Testing and Materials*) designado E96-66.

Inicialmente, no interior de cada cúpula de permeabilidade (modelo *Payne permeability cup*, Bélgica) foram adicionados 10,0 mL de água destilada. Em seguida, os filmes candidatos à investigação, com área de 9,62 cm<sup>2</sup>, foram fixados às cúpulas individualmente. O conjunto (cúpula + água destilada + amostra filme) foi pesado no tempo zero e armazenado em dissecador contendo sílica-gel. As cúpulas, em triplicata, para cada filme, foram pesadas nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h. A cada intervalo de tempo pré-estabelecido, a sílica-gel era trocada por outra desidratada (50 °C/24 h). A diferença de massa das cúpulas em cada intervalo de tempo foi registrada e aplicada na Equação [1] para calcular a taxa de transmissão de vapor d'água através dos filmes isolados.

$$TVA = \frac{g \times 24}{t \times a} \quad (1)$$

Onde, *g* é a perda de massa em gramas, *t* é tempo em *h* e *a* a área do filme em m<sup>2</sup>.

### ***Determinação do índice de intumescimento***

Os filmes das diferentes associações foram minuciosamente cortados com tesoura cirúrgica (modelo Professional F/1) em aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup>, sendo em seguida distribuídos no interior de placas de Petri devidamente identificadas. Posteriormente, as placas de Petri foram colocadas em estufa a 50 °C, por aproximadamente 24 h, atingindo massa constante. Após este tempo, as placas foram retiradas e mantidas em dissecadores durante a realização do experimento. Amostras dos filmes secos representantes das diferentes composições foram pesadas em balança analítica, e imediatamente imersas em recipiente por diferentes intervalos de tempo à temperatura ambiente, contendo Fluido de Simulação Gástrica (FSG) e Fluido de Simulação Intestinal (FSI) preparado conforme a 23<sup>a</sup> ed. Farmacopéia dos Estados Unidos da América, sem a presença de enzimas. Em cada intervalo de tempo pré-estabelecido às amostras (em triplicata) foram removidas dos meios com auxílio de pinça e cuidadosamente enxugadas, entre duas folhas de papel de filtro, e repesadas retirando o excesso de fluido. Foram retiradas amostras nos intervalos de 1, 10, 30, 60, 75, 90, 105 e 120 min de imersão. Para o

cálculo do índice de intumescimento (Ii%) foi utilizada a Equação [2] (Blanchon et al., 1991) a seguir:

$$Ii\% = \frac{P_i - P_s}{P_s} \times 100 \quad (2)$$

Onde  $P_i$  é o peso do filme intumescido, no tempo correspondente, e  $P_s$  é o peso do filme seco.

### ***Calorimetria diferencial de varredura***

A calorimetria diferencial de varredura foi realizada utilizando-se 6 mg das diferentes associações com um calorímetro Netzch DSC-204 em uma atmosfera com fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. As amostras foram aprisionadas em cadinho de alumínio com tampa furada e submetidas a um programa de aquecimento controlado; 0-600°C à uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto. Antes disso foi aplicada uma isoterma de 100°C por 15 min objetivando a perda total de umidade. A diferença de fluxo de calor da amostra foi controlada, verificando-se a perda ou ganho de energia da amostra pela variação da entalpia esboçada em gráficos por picos endotérmicos e exotérmicos (Cavalcanti et al., 2004).

### ***Análise termogravimétrica***

Foram conduzidos experimentos para investigar a estabilidade térmica, por termogravimetria, das diferentes associações candidatas, utilizando-se um aparelho Netzsch TGA-204. Foram utilizadas aproximadamente 10 mg de amostra em uma atmosfera de fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. A faixa de temperatura foi de 0-600°C a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto (Cavalcanti et al., 2004).

### ***Análise estatística***

As análises estatísticas foram utilizadas para determinar o nível de significância existente entre os valores obtidos em todos os ensaios envolvendo os

filmes. Estas análises foram realizadas com ajuda do programa *GraphPad Prism*® (versão 2.01, 1996). Os diferentes resultados referentes aos coeficientes de li% e TVA, obtidos em FSG e FSI, foram inicialmente avaliados usando análise de variância (ANOVA), sendo os resultados considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Quando o conjunto desses valores forneceu parâmetros significativos, foi realizada aplicação das médias dos dados obtidos no teste de múltipla comparação de Tukey, visando comparar o papel das diferentes composições poliméricas. Também sendo considerados significativos os valores registrados para  $p < 0,05$  (Cavalcanti et al., 2002; Cavalcanti et al., 2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

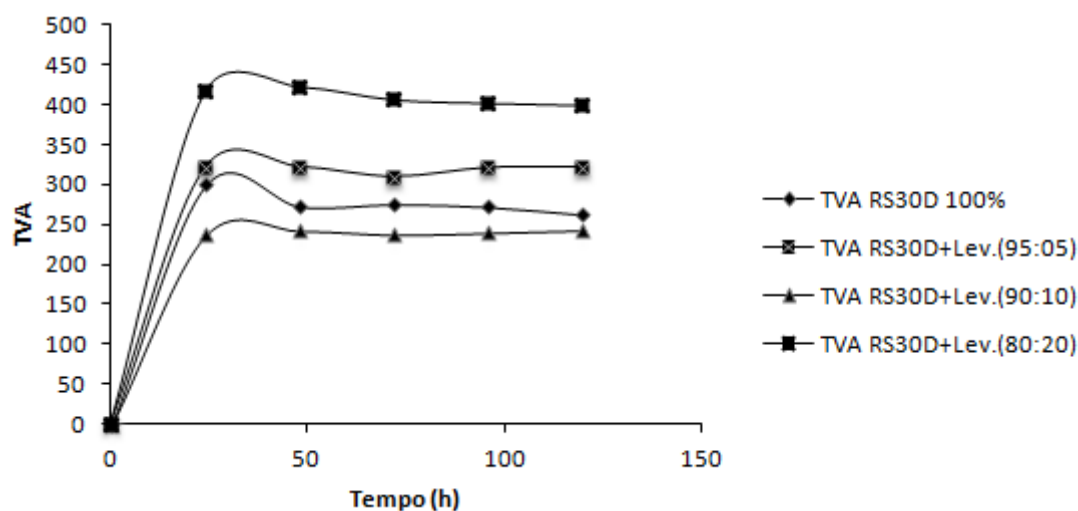
### ***Caracterização Morfológica Macroscópica e determinação da espessura dos filmes***

A caracterização morfológica macroscópica dos filmes, bem como a determinação da sua espessura, são etapas críticas para se garantir a reprodutibilidade dos ensaios propostos (Cavalcanti et al., 2002). Deve-se atentar para a presença de rachaduras, bolhas de ar, homogeneidade de espessura ou quaisquer outras imperfeições. Os filmes obtidos por evaporação (casting process) em placas de Teflon®, a partir de dispersões poliméricas de base aquosa, não apresentaram rachaduras ou bolhas de ar, bem como não apresentaram evidências de incompatibilidades entre a levana e o polímero sintético Eudragit RS30D®. A compatibilidade que certos polissacarídeos possuem, frente à polímeros polimetacrilatados, são amplamente divulgados pela literatura científica. Cavalcanti et al. (2002) avaliaram a permeabilidade e hidratação de filmes polimetacrilatados aditivados com o polissacarídeo inulina. Não houve incompatibilidades entre os polímeros polimetacrilatados e a inulina; quimicamente muito semelhante à levana (Jain, Gupta e Jain, 2007). Pelos estudos revisados foi possível sugerir que a levana provavelmente não apresentaria incompatibilidade com o polímero polimetacrilatado Eudragit RS30D®; reforçando a sua aplicabilidade em filmes isolados. Os filmes obtidos, com a adição de levana, apresentaram homogeneidade na espessura entre as várias formulações testadas do grupo ( $p=0,119$ ). Os filmes aditivados com levana apresentaram apenas opacidade; não sendo detectadas alterações de flexibilidade.

### Transmissão de vapor d'água (TVA)

A transmissão de vapor d'água (TVA) avalia a hidrofília dos polímeros presentes nos filmes, bem como oferece um índice na qual é possível relacionar a mobilidade da matriz polimérica frente às moléculas de vapor de água (MONDAL e YONG, 2006). Os resultados revelam que a levana alterou a permeabilidade dos filmes quando comparados entre si, incluindo o controle 100%.

O ensaio de TVA, para os filmes Eudragit RS30D<sup>®</sup> (ER) e levana (L), pode ser visto na Figura 1.



**Figura 1** – Transmissão do vapor de água dos filmes nas diferentes associações – Eudragit RS30D e levana de *B. subtilis* NATTO (n=3).

As formulações ERL 95:05 e ERL 80:20 tiveram um aumento do TVA condizente ao aumento da participação do exopolissacarídeo nos filmes isolados;  $p < 0,001$ . O maior TVA foi obtida na formulação ERL 80:20; devido à maior participação do polissacarídeo. A levana apresenta grande quantidade de grupos funcionais hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) que pode aumentar a hidrofília do sistema (Bunhak et al., 2007). Entretanto, na formulação ERL 90:10, a densidade da matriz polimérica aumentou, restringindo a difusão de moléculas de vapor de água pela diminuição do volume livre (Mondal e Young, 2006). Este aumento da densidade da malha polimérica pode ser inferido pelas alterações de cristalinidade e interações inter cadeias evidenciada pela caracterização térmica.

### ***Determinação do Índice de Intumescimento (Ii%)***

O intumescimento permite avaliar a hidrofília dos polímeros constituintes do filme isolado através do seu comportamento de hidratação inferida pelo índice de intumescimento. Segundo Cavalcanti et al. (2002) uma hidrofília moderada, avaliada por intumescimento em fluídos fisiológicos, fornece uma forte expectativa da garantia do acesso ao cólon das bactérias existentes na porção distal do TGI. Os índices de intumescimento, para as formulações ERL, podem ser vistas na Tabela 1 respectivamente. Os desvios padrões foram considerados adequados; haja vista que estudos anteriores apresentaram desvios padrões maiores que o nosso (>20) neste mesmo tipo de metodologia (Akhgari et al., 2006).

**Tabela 1** – Índice de intumescimento das formulações ERL em fluído de simulação gástrico (FSG) e intestinal (FSI) (média dos dados  $\pm$  S.D.; n=3)

| Formulação | Índice de intumescimento, Ii (%) |                   |
|------------|----------------------------------|-------------------|
|            | FSG                              | FSI               |
| ER 100%    | 21,63 $\pm$ 7,85                 | 34,13 $\pm$ 10,70 |
| ERL 95:05  | 48,87 $\pm$ 19,45                | 43,10 $\pm$ 16,40 |
| ERL 90:10  | 60,05 $\pm$ 26,70                | 67,85 $\pm$ 14,24 |
| ERL 80:20  | 18,66 $\pm$ 10,45                | 43,72 $\pm$ 11,77 |

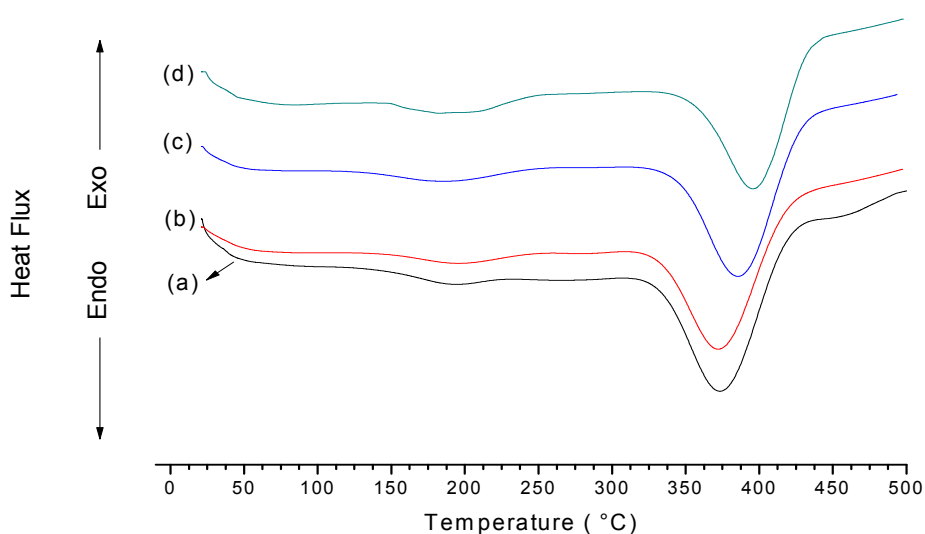
Conforme a Tabela 1, a levana influenciou no índice de intumescimento das formulações ERL 95:05 e 90:10 em FSG; sendo relativamente proporcional a participação do exopolissacarídeo no filme. Entretanto, a formulação ERL 80:20 não apresentou diferenças estatísticas quando comparado ao controle ER 100% em FSG ( $p=0,074$ ). A levana, em maiores concentrações, pode alterar as interações intercadeias e conseqüentemente alterar a densidade da malha polimérica das formulações; resultando numa hidratação não significativa como na formulação ERL 80:20. Esta alteração de cristalinidade pode ser verificada nos ensaios de mobilidade das cadeias poliméricas e caracterização térmica. Em FSI, apenas a formulação ERL 90:10 apresentou significativamente diferente ao controle ( $p<0,001$ ). Nas formulações ER 100% e ERL 80:20, o intumescimento foi maior em



FSI do que em FSG; respectivamente  $p=0,028$  e  $p=0,0012$ . Tal comportamento pode ser explicado pela presença de grupos amônio quaternário no Eudragit RS30D que estão na forma de sal clorídrico. A dissociação destes grupos é responsável pelo intumescimento dos filmes poliméricos. O FSG apresenta ânions clorídrico que apresentam menor seletividade por trocas iônicas ao fosfato presente no FSI. Conseqüentemente ocorre menor hidratação dos filmes em FSG quando comparados aos filmes imersos em FSI (Akhgari et al., 2006). Embora possa ocorrer dissociação dos grupos de amônio quaternário, também se pode esperar que não ocorram diferenças significativas entre as formulações imersas em FSG e FSI.

### **Análises térmicas (DSC e TGA)**

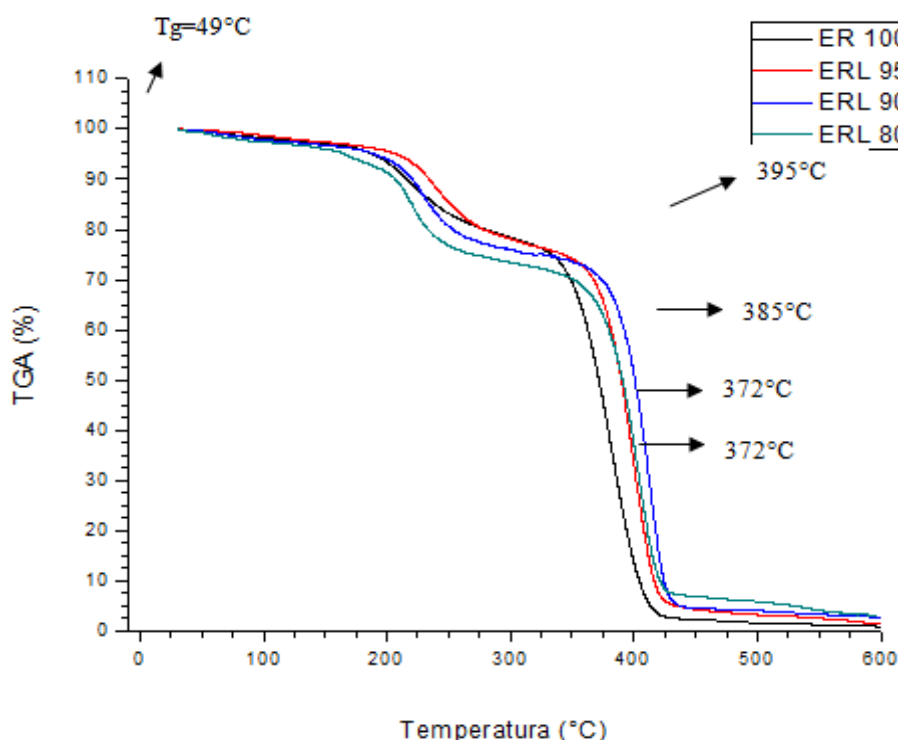
A calorimetria diferencial de varredura permite a análise do perfil energético das amostras num intervalo específico de temperatura. Estudos costumam evidenciar eventos endotérmicos largos ( $35^{\circ}\text{C}$ - $160^{\circ}\text{C}$ ) atribuídos à perda de água, bem como eventos endotérmicos referentes à sua fusão; eventos endo e exotérmicos também podem corresponder à decomposição térmica dos produtos (CAVALCANTI et al., 2004). As curvas de DSC, para os filmes a base de Eudragit RS30D<sup>®</sup>, podem ser vistos na Figura 2 respectivamente.



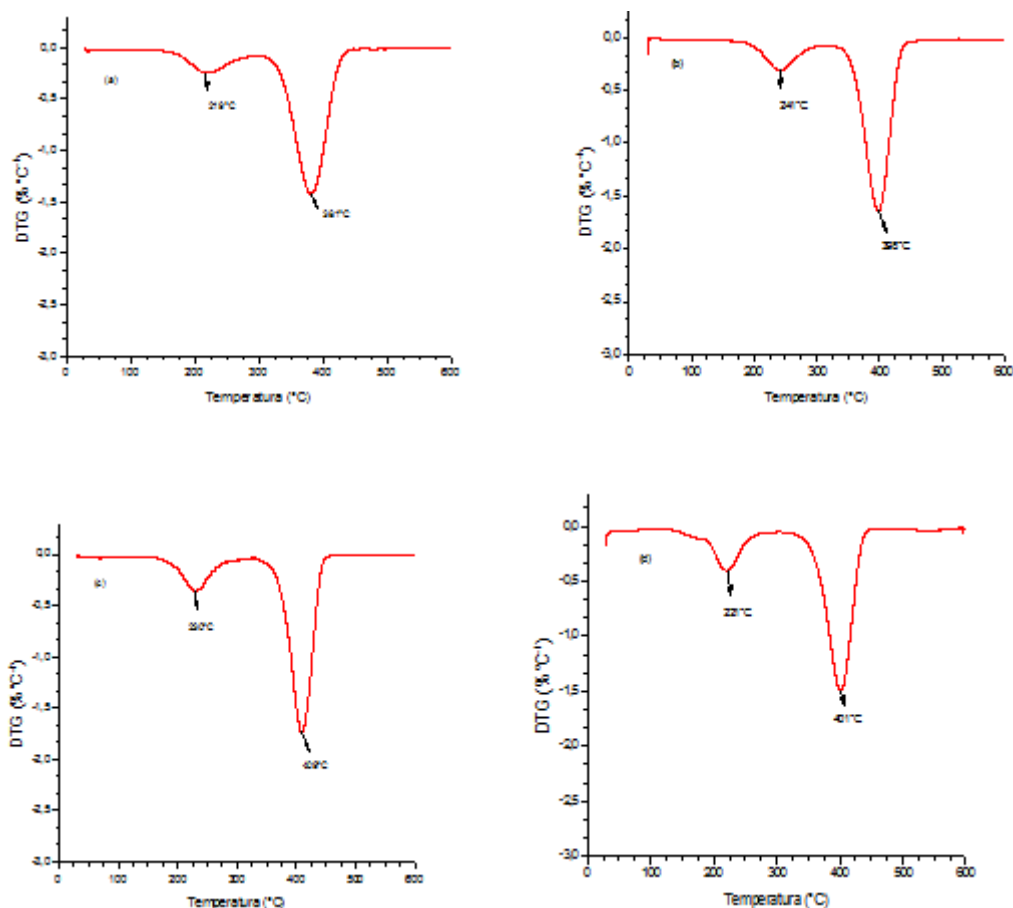
**Figura 2** – Curvas da calorimetria diferencial de varredura das diferentes associações Eudragit RS 30D: Levana a) ER 100% b) ERL 95:05 c) ERL 90:10 d) ERL 80:20

O pico endotérmico da decomposição foi deslocado conforme a participação crescente da levana nas formulações ERL 90:10 e 80:20. Segundo Kanis et al. (2006), alterações na temperatura de decomposição podem ser devidas às mudanças na cristalização das cadeias. Ainda segundo o autor, as alterações na cristalização da cadeia ocorrem conforme mudança na interação intercadeias do sistema polimérico. A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), para as formulações ERL, ficou aproximadamente em 49°C.

Estes resultados corroboram com Abbaspour, Sadeghi e Garekani (2007) que especificaram a temperatura vítrea do Eudragit RS como 50°C. Ainda segundo Haines e Wilburn (1995) estas variações nas  $T_g$  podem ser devidas às diferenças nos equipamentos e condições de análise. É importante destacar que a formação do filme é beneficiada por valores de  $T_g$  baixo (WEI et al., 2009). Nenhuma diferença significativa foi observada entre as formulações ER controle e aquelas aditivadas com levana (DP=3,28); inferindo que a levana não influenciou na transição vítrea destas formulações. Os perfis termogravimétricos podem ser vistos na Figura 3 e as curvas termogravimétricas derivadas podem ser verificadas na Figura 4.



**Figura 3** – Curvas da termogravimetria dos filmes isolados Eudragit RS30D® aditivados com levana de *B. subtilis* NATTO.



**Figura 4** – Curvas de termogravimetria derivada das diferentes associações de filmes Eudragit RS 30 D: Levana: a)ER 100, b)ERL 95:05, c)ERL 90:10 e d)ERL 80:20.

As análises termogravimétricas avaliam a estabilidade térmica dos compostos enquanto a derivada das curvas de TGA facilita a observação de diferentes estágios de degradação. As curvas de TGA e DTG, para as formulações ERL, indicaram perdas de massa entre 218,9°C e 241,5°C, e 381,1°C e 409,4°C; portanto dois estágios de degradação em altas temperaturas. Em média, 94,08% da massa foi perdida entre 150°C e 450°C; período de maior degradação térmica. Não foram observadas diferenças significativas na perda de massa, entre as diferentes formulações contendo Eudragit RS30D e levana, para temperaturas de até 150°C (ER 98,64±0,83; ERL95:05 98,97±0,84; ERL90:10 98,42±1,01 e ERL80:20 97,99±1,13). As formulações, com maiores concentrações de levana, apresentaram menores perdas de massa durante o ensaio; 97,43% e 96,95% para ERL 90:10 e 80:20 respectivamente, e 99,09% e 99,15% para ER e ERL 95:05.

Estes resultados foram considerados positivos haja vista que o novo material polimérico, aditivado com levana, apresentou altas temperaturas de

degradação; bem como a levana não influenciou na estabilidade térmica do material até 150°C.

### **Conclusões**

A elaboração de “medicamentos inteligentes” através do uso de produtos oriundos da biotecnologia certamente estabelece imensuráveis desafios no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos, prioritariamente cólon-específicos.

Os resultados deste estudo sugerem que o exopolissacarídeo levana, produzido pelo *B. subtilis* NATTO, quando incorporado ao Eudragit RS 30D® na formação de filmes isolados, forneceu subsídios iniciais promissores quanto à perspectiva de aplicação deste material no desenvolvimento de sistema voltado à liberação cólon-específica.

A levana e o Eudragit RS 30D foram compatíveis, não ocorrendo separação de fases durante o processo de fabricação do filme. A levana também influenciou na mobilidade das cadeias do Eudragit RS 30D nas formulações ERL 95:05 e ERL 80:20, entretanto a densidade da matriz polimérica aumentou na ERL 90:10. Em concentrações mais baixas, a levana aumentou o intumescimento do sistema. O novo material polimérico também apresentou altas temperaturas de degradação (entre 150°C e 450°C).

Estes resultados nos permitem sugerir que os filmes isolados produzidos neste trabalho poderão, após estudos complementares, ser utilizados para revestimento de sólidos orais destinados ao tratamento de patologias que acometem o cólon.

## REFERÊNCIAS

- Abbaspour MR, Sadeghi F, Garekani HA (2008). Design and study of ibuprofen disintegrating sustained-release tablets comprising coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68:747–759.
- Abbaspour MR, Sadeghi F, Garekani HA (2007). Thermal treating as a tool to produce plastic pellets based on Eudragit RS PO and RL PO aimed for tableting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67:260–267.
- Akhgari A, Farahmand F, Garekani HA, Sadeghi F, Vandamme TF (2006). Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. *European journal of pharmaceutical sciences*. 28:307-314.
- Blanchon S, Couarraze G, Rieg-Falsen F, Cohen G, Puisieux F (1991). Permeability of progesterone and synthetic progestin through methacrylic films. *International Journal of Pharmaceutics*. 72:1-10.
- Bunhak EJ, Mendes ES, Pereira NC, Cavalcanti OA (2007). Influência do Sulfato de Condroitina na Formação de Filmes Isolados de Polimetacrilato. Avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d' água. *Acta Farm. Bonaerense*. 26:89-95.
- Cavalcanti OA, Mooter GVD, Soares IC, Kinget R (2002). Polysaccharides as Excipients for Colon-Specific Coatings. Permeability and Swelling Properties of Casted Films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 28:157-164.
- Cavalcanti OA, Petenuci B, Bedin AC, Pineda EAG, Hechenleitner AAW (2004). Characterisation of Ethylcellulose Films containing Natural Polysaccharides by Thermal Analysis and FTIR Spectroscopy Natural Polysaccharides by Thermal Analysis and FTIR Spectroscopy. *Acta Farm. Bonaerense*. 23 : 53-7.
- De Paula VC, Pinheiro IO, Lopes CE, Calazans GMT (2008). Microwave-assisted hydrolysis of *Zymomonas mobilis* levan envisaging oligofructan production. *Bioresource Technolog*.99:2466-2470.
- Haines PJ, Wilburn FW (1995). Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry. In: Haines PJ (1995). *Thermal Methods of Analysis: principles, applications and problems*. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 63-122.
- Jain, A.; Gupta, y.; Jain, s. K (2007). Perspectives of Biodegradable Natural Polysaccharides for Site-Specific Drug Delivery to the Colon. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci*.10:86-128.
- Kanis LA, Generoso M, Meier MM, Pires ATN, Soldi V (2005). Poly(ethylene-co-methyl acrylate) membranes as rate-controlling barriers for drug delivery systems: characterization, mechanical properties and permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60 : 383–390.
- Mondal, S.; Yong, JLHZ (2006). Free volume and water vapor permeability of dense segmented polyurethane membrane. *Journal of Membrane Science*. 208:427-432.

Oliveira MR, Silva RSSF, Buzato JB, Celligoi MAPC (2007). Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal*. 37:177–183.

Pitarresi G, Casadei MA, Mandracchia D, Paolicelli P, Palumbo FS, Giammona G (2007). Photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives: A combination suitable for colon-specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 119:328–338.

Sinha VR, Mittal BR, Bhutani KK, Kumria R (2004). Colonic drug delivery of 5-fluorouracil: an in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 269:101-108.

Wei H, Li-fang F, Bai X, Chun-Lei L, Qing D, Young-Zhen C, De-Ying C (2009). An investigation into the characteristics of chitosan/Kollocoat SR30D free films for colonic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 72(1):266-274.

## CONCLUSÕES

- A produção de levana, a partir de *B. subtilis* NATTO, foi favorecida principalmente pelo aumento da concentração de sacarose. A condição ótima para a produção de levana, a partir de *B. subtilis*, foi obtida utilizando-se 400 g/L de sacarose com 16 h de tempo de cultivo; com uma produção de 111,6 g/L e produtividade de 6,975 g/L.h.
- As amostras apresentaram duas faixas de massas molares, aproximadamente 568 K Da e < 50 K Da; nas quantidades 13,39% e 86,61% respectivamente.
- A levana, produzida pelo *B. subtilis* NATTO, apresentou um comportamento Newtoniano (viscosidade independente da taxa de cisalhamento).
- A levana mostrou-se não citotóxica para as células CHO-K1, bem como nenhum tratamento aumentou a frequência de micronúcleos para células CHO-K1 quando comparado com o controle; não apresentando potencial toxicológico e mutagênico.
- Os filmes não apresentaram evidências de incompatibilidades entre os polímeros sintéticos e a levana. A levana, devido aos seus grupos hidroxilas, pode aumentar a hidrofilia do sistema refletindo em aumento do intumescimento e TVA. O novo material polimérico apresentou altas temperaturas de degradação; bem como a levana não influenciou na estabilidade térmica do material até 100°C.

## REFERÊNCIAS

- ABBASPOUR, M.R.; SADEGHI, F.; GAREKANI, H. A. Design and study of ibuprofen disintegrating sustained-release tablets comprising coated pellets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.68, p.747–759, 2008.
- ABBASPOUR, M. R.; SADEGHI, F.; GAREKANI, H. A. Thermal treating as a tool to produce plastic pellets based on Eudragit RS PO and RL PO aimed for tableting. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.67, p. 260–267, 2007.
- 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.
- ABREU, W. M. **Estudo da Temperatura de Transição Vítreia (tg) em Vidros Orgânicos: Mel, Corante caramelo, e Frutose**. Ouro Preto, 2008. 187p. Dissertação de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais da REDEMAT, UFPO, CETEC, UEMG.
- AKHGARI, A.; FARAHMAND, F.; GAREKANI, H. A.; SADEGHI, F.; VANDAMME, T. F. Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. **European journal of pharmaceutical sciences**, v.28, p.307-314, 2006.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42 (3), p.291-297, 1999.
- ARVIDSON, S. A.; RINEHART, B. T.; GADALA-MARIA, F. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. **Carbohydrate Polymers**, v.65, p.144–149, 2006.
- AVINERI-SHAPIRO, S.; HESTRIM, S. The Mechanism of Polysaccharide Production from Sucrose. **Biochemical Journal**, v.39(2), p.167-172, 1945.
- 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.
- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA. M. L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v.338, p.1691-1698, 2003.
- BASAN, H.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M.; ORBEY, M. T. Release characteristics of salmon calcitonin from dextran hydrogels for colon-specific delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.65, p.39–46, 2007.
- BATISTA, M. C. T. **Efeito das condições de cultivo na produção de levana de alta massa molar por *Zymomonas mobilis* em meio de caldo de cana de**



**açúcar.** Londrina, 2006. 82p. Dissertação de mestrado – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – Universidade Estadual de Londrina.

BECKERT, T. Eudragit® Makes it possible. *Pharma Polymers*, v.7, p. 1-3, 2000.

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

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v.28(3), p.625–631, 2007.

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(3), p.604-609, 2006.

BOX, G. E. P.; HUNTER, S. W.; HUNTER, J. S. **Statistic for experiments and introduction to design. Data analysis and model building.** Jonh Wiley, Inc., New York, p.653, 1976.

BLANCHON, S.; COUARRAZE, G.; RIEG-FALSEN, F.; COHEN, G.; PUISIEUX, F. Permeability of progesterone and synthetic progestin through methacrylic films. **International Journal of Pharmaceutics**, v.72, p.1-10, 1991.

BRESOLIN, T. M. B.; RODRIGUES, C. A.; ANDREAZZA, I. F.; LUCINDA, R. M.; ANDREAZZA, R. C. S.; FREITAS, R. A.; MOURÃO, S. C. Sistemas de Liberação de Fármacos. In: BRESOLIN, T. M., FILHO, V. C.(org). **Ciências farmacêuticas: uma Contribuição ao estudo de novos fármacos e medicamentos.** Itajaí: Editora da universidade do Vale do Itajaí, 2003.cap. 4, p.169-227.

BUNHAK, E.J.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; CAVALCANTI, O. A. Influência do Sulfato de Condroitina na Formação de Filmes Isolados de Polimetacrilato. Avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d' água. **Acta Farm. Bonaerense**, V.26(1), P.89-95, 2007.

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 (1), p. 19–21, 1997.

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

CASADEI, M. A.; MATRICARDI, P.; FABRIZI, G.; FEENEY, M.; PAOLICELLI, P. Physical gels of a carboxymethyl derivative of scleroglucan: Synthesis and

characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.67, p.682-689, 2007.

CAVALCANTE, A. H. M.; CARVALHO, L. B.; CUNHA, M. G. C. Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. as a film support for trypsin immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v.29, p.258–261, 2006.

CAVALCANTI, O. A.; MOOTER, G. V. D.; SOARES, I. C.; KINGET, R. Polysaccharides as Excipients for Colon-Specific Coatings. Permeability and Swelling Properties of Casted Films. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.28 (2), p.157-164, 2002.

CAVALCANTI, O. A.; PETENUCCI, 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 Farm. Bonaerense**, v. 23, p.53-57, 2004.

CHOI, S. H.; SUNG, C.; CHOI, W, Y. Levan-producing *Bacillus subtilis* BS 62 and its phylogeny based on its 16S rDNA sequence. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.11(3), p.428-434, 2001.

COLINET, I.; PICTON, L.; MULLER, G.; CERF, D. L. pH-dependent stability of scleroglucan borate gels. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.65–71, 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução à métodos cromatográficos**. Campinas: Unicamp, 6 ed., 1995.

COUTAND, M.; DEYDIER, E.; CYR, M.; MOUCHET, F.; GAUTHIER, L.; GUILLET, R.; BERNUES SAVAETE, L.; CREN, S.; CLASTRES, P. Evaluation of laboratory and industrial meat and bone meal combustion residue as cadmium immobilizing material for remediation of polluted aqueous solutions: “*Chemical and ecotoxicological studies*”. **Journal of Hazardous Materials**, v.166, p.945-953, 2009.

COVIELLO, T.; ALHAIQUE, F.; PARISI, C.; MATRICARDI, P.; BOCCHINFUSO, G.; GRASSI, M. A new polysaccharidic gel matrix for drug delivery:

preparation and mechanical properties. *Journal of Controlled Release*, v.102, p.643–656, 2005.

DELUCIA, R.; PLANETA, C. S.; FILHO, R. M. O. In: DELUCIA, R.; FILHO, R. M. O. **Farmacologia integrada**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. cap 8, p-56-57.

DELUCIA, R. In DELUCIA, R.; PLANETA, C. S.; FILHO, R. M. O.; GALLACCI, M.; AVELLAR, M. C. W. **Farmacologia integrada**. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. cap 4, p-39-44.

DE 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.

DUBOC, P.; MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v.11, p.759–768, 2001.

DUPUIS, G.; CHAMBIN, O.; GÉNELOT, C.; CHAMPION, D.; POURCELOT, Y. Colonic Drug Delivery: Influence of Cross-linking Agent on Pectin Beads Properties and Role of the Shell Capsule type. **Drug Dev. Ind. Pharm**, v.32, p.847-855, 2006.

EUZENAT, O.; GUILBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v.32 (3), p.237-243, 1996.

FRANÇA, E. **Produção de filmes automontados constituídos por polianilina associados ao exopolissacarídeo fúngico botriosferana**. Londrina, 2007, 73p. Dissertação de mestrado – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina.

FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p.247-265, 2005.

FÖHNER, C. R. A. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum***. Florianópolis, 2003, 135p. Dissertação de mestrado – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina.

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 of Biotechnology and Biochemistry**, v.3(2), p.47-54, 2007.

GERSHKOVICH, P.; QADRI, B.; YACOVAN, A.; AMSELEM, S.; HOFFMAN, A. Different impacts of intestinal lymphatic transport on the oral bioavailability of structurally similar synthetic lipophilic cannabinoids: Dexanabinol and PRS-211,220. **European journal of pharmaceutical sciences**, v.31, p.298-305, 2007.

GORREC, K. L.; CONNES, C.; GUIBERT, A.; URIBELARREA, J. L.; COMBES, D. Identification of three inducible and extracellular enzymatic activities working on sucrose in *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 and 11872 supernatant. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.44-52, 2002.

HAINES, P. J.; WILBURN, F. W. Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry. In: HAINES, P. J. **Thermal Methods of Analysis: principles, applications and problems**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. P. 63-122.

HAN, Y. W.; WATSON, M. A. Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. **Journal of Industrial Microbiology**, v.9, p.257-260, 1992.

HARRINGTON, P. A.; HEYL, F. In: CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 1999. cap.12, p.426-427.

HARWOOD, CR. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends in Biotechnol**, v. 10, p. 247-256, 1992.

HESTRIN, S.; SHAPIRO, S. A.; ASCHNER, M. The Enzymic Production of Levan. **Biochemical journal**, v.37(4), p.450-456, 1943.

- HIRSCH, S.; BINDER, V.; SCHEHLMANN, V.; KOLTER, K., BAUER, K. H. Lauroyldextran and crosslinked galactomannan as coating materials for site-specific drug delivery to the colon. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.47, p.61–71, 1999.
- HUANG, Y.; YU, H.; XIAO, C. pH-sensitive cationic guar gum/poly (acrylic acid) polyelectrolyte hydrogels: Swelling and in vitro drug release. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.774-783, 2007.
- IBEKWE, V. C.; FADDA, H. M.; PARSONS, G. E.; BASIT, A. W. A comparative in vitro assessment of the drug release performance of pH-responsive polymers for ileo-colonic delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.308, p.52-60, 2006.
- IM-KYUNG, O. H.; YOO, S.; BAE, I.; Y.; CHA, J.; LEE, H. G. Effects of *Microbacterium laevaniformans* Levans Molecular Weight on Cytotoxicity. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14(5), p.985-990, 2004.
- JAIN, A.; GUPTA, Y.; JAIN, S. K. Azo Chemistry and Its Potential for Colonic Delivery. **Drug Carrier Systems**,v.23, p.349-399, 2006.
- JAIN, A.; GUPTA, Y.; JAIN, S. K. Perspectives of Biodegradable Natural Polysaccharides for Site-Specific Drug Delivery to the Colon. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v.10, p.86-128, 2007.
- JANTZEN, G. M.; ROBINSON, J. R. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. In: BANKER, G. S.; RHODES, C. T. **Modern Pharmaceutics**. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, 1996. cap.15, p.575-592.
- JÖRDENING, H. J.; WINTER, J. Bioremediation—Keeping the Earth clean. **Biotechnology Advances**, v.23, p.371–372, 2005.
- KALOGERAKIS, N.; PSILLAKIS, E.; ALVAREZ, P. Special issue: recent advances in bioremediation. **Environment International**, v.31, p.147, 2005.
- KANDA, D. H. F.; ALVES, W. F.; MALMONGE, J. A.; MALMOMGE, L. F. Análise da temperatura de transição vítrea de blendas de poliuretano com poma. In:Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 1, Foz do Iguaçu, 2006. **Anais**.
- KANG, S. A.; JANG, K. H.; SEO, J. W.; KIM, K. H.; KIM, Y. H.; RAIKAKHWADA, D.; SEO, M. Y.; LEE, J. O.; HA, S. D.; KIM, C. H.; RHEE, S. K. Levan: Applications and Perspectives. In: REHM, B. H. A. **Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors**. Horizon Scientific Press, 2009, cap.6, p.152,155.
- KUMAR, S. C.; SATISH, C. S.; SHIVAKUMAR, H. G. Formulation and evaluation of chitosan-gellan based methotrexate implants. **Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry**, v.45(8), p.643-649, 2008.
- LAMIM, L. *Quitosana e N – Carboximetilquitosana: Desenvolvimento de biofilmes para aplicações farmacêuticas*. Itajaí, 2006. 78p. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências da Saúde – Universidade do Vale do Itajaí.

LI, H. Q.; SCHENK, A.; SRIVASTAVA, A.; ZHURINA, D.; ULLRICH, M. S. Thermo-responsive expression and differential secretion of the extracellular enzyme levansucrase in the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **FEMS Microbiology Letters**, v.265(2), p.178-185, 2006.

LU, D. X.; WEN, X. T.; LIANG, J.; GU, Z. W.; ZHANG, X. D.; FAN, Y. J. A pH-Sensitive Nano Drug Delivery System Derived from Pullulan/Doxorubicin Conjugate. **Journal of Biomedical Materials Research part B – Applied Biomaterials**, v.89B(1), p.177-183, 2009.

MACIEL, J. C. **Síntese e caracterização de partículas de levana-magnetita e sua utilização como matriz para imobilização de tripsina**. Recife, 2008. 94p. Dissertação de mestrado – Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco.

MALLEUX, K.; VAN DEN ENDE, W. Levans in excised leaves of *Dactylis glomerata*: Effects of light, sugars, temperature and senescence. **Journal of Plant Biology**, v.50, p.871-680, 2007.

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.18, p.287-298, 2004.

MARQUES, T. A.; BERTÉ, S. D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Condições de fermentação na produção de levana por *Bacillus subtilis* (Natto) isolado de grãos de soja fermentada. In. SEMANA DE BIOTECNOLOGIA, 4, Londrina, 2008. **Anais**. Universidade Estadual de Londrina, p.12.

MATTOON, J. R.; HOLMLUND, C. E.; SCHEPARTZ, S. A.; VAVRA, J. J.; JOHNSON, M. J. Bacterial Levans of Intermediate Molecular Weight. **Applied Microbiology**. V.3(6), p.321-333, 1955.

MELO, I. R.; PIMENTEL, M. F.; 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.

MERCK index. 12.ed. Withehouse Station, 1996.

MIRANDA, C.C.B.O.; DEKKER, R. F. H.; SERPELONI, J. M.; FONSECA, E. A. I.; CÓLUS, I. M. S.; BARBOSA, A. M. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.42, p.172–177, 2008.

MONDAL, S.; YONG, J. L. H. Z. Free volume and water vapor permeability of dense segmented polyurethane membrane. **Journal of Membrane Science**, v.208, p.427-432, 2006.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia orientada para a clínica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.p.219.

MOORE, S.; STEIN, W. H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. **The journal of Biological Chemistry**, v. 176, p.367-388, 1948.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MUNDARGI, R. C.; PATIL, S. A.; AGNIHOTRI, S. A.; AMINABHAVI, T. M. Development of polysaccharide-based colon targeted drug delivery systems for the treatment of amoebiasis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.33(3), p.255-264, 2007.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, v.84, p.375-380, 1944.

OLIVEIRA, F. M. **Pré-biótico na pesquisa e desenvolvimento de novos materiais para liberação modificada de fármacos**. Maringá, 2006. 34p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmácia e Farmacologia – Universidade Estadual de Maringá.

OLIVEIRA, F. M.; CAVALCANTI, O. A. Pré-Bióticos na Formação de Filmes Isolados de Eudragit® RS 30 D. Avaliação das Propriedades de Intumescimento e Permeabilidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26 (3), p. 325-331, 2007.

OLIVEIRA, R. V. B.; ROEDER, J.; SOLDI, V.; PIRES, A. T. N. Degradação térmica das blendas de PET/PS e PET/EPDM compatibilizadas com PS-co-AM ou EPDM-g-AM. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2, Poços de Caldas, 2000. **Anais**.

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.

OUWEHAND, A. C.; DERRIEN, M.; TIIHONEN, W. V. K.; RAUTONEN, N. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.212-217, 2005.

PACCEZ, J. D. **Aplicação de linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* no desenvolvimento de vacinas de mucosas contra patógenos entéricos**. São Paulo, 2007. 91p. Dissertação de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.

PARK, Y. K.; MORTATTI, M. P. L.; SATO, H. H. Study of levan formation during fermentation on *Zymomonas mobilis* on sucrose. **Biotechnology Letters**, v.5(8), p.515-518, 1983.

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.

PIERMARIA, J. A.; PINOTTI, A.; GARCIA, M. A.; ABRAHAM, A. G. Films Based on Kefiran, an Polysaccharide Obtained From Kefir Grains: Development and Characterization. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.684-690, 2009.

PITARRESI, G.; CASADEI, M. A.; MANDRACCHIA, D.; PAOLICELLI, P.; PALUMBO, F. S.; GIAMMONA, G. Photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives: A combination suitable for colon-specific drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.119, p.328–338, 2007.

PRASERTSAN, P.; WICHIENTHOT, S.; DOELLE, H.; KENNEDY, J. F. Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p.468-475, 2008.

QUINTANILHA, A. G.; ZILBERSTEIN, B.; SANTOS, M. A. A.; PAJECKI, D.; MOURA, A. G. H.; ALVES, P. R. A.; MALUF – FILHO, F.; CECCONELLO I. A novel sampling method for the investigation of gut microbiota. **World J. Gastroenterol**, v.13, p.3990-3995, 2007.

RABITO, M. F. **Arabinosilana na formação de filmes isolados: material candidato à liberação modificada de fármacos**. Maringá, 2009. 65p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

RAHULAN, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SZAKACS, G.; NAGY, V.; PANDEY, A. Statistical optimization of L-leucine amino peptidase production from *Streptomyces gedanensis* IFO 13427 under submerged fermentation using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v.43, p.64-71,2009.

RAMSAY, A.; COOPER, D. G.; NEUFIELD, R. J. Effects of oil reservoir conditions on the production of water-insoluble levan by *Bacillus licheniformis* . **Geomicrobiology Journal**, v.7(3), p.115-165, 1989.

RINGE, K.; RADUNZ, H. Producing a delivery vehicle for transfection of cells, involves forming oil/water type miniemulsion, polymerizing the monomers to form nanoparticles, and adding pharmaceutical agents capable of being bound to the nanoparticles. Pat. WO2006056362-A2, 1 jun. 2006. 37p.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digest Liver**, v.34, p.185-190, 2002.

ROLL, R. J. **Avaliação da genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* através do ensaio cometa e teste de micronúcleos**. Rio Grande do Sul, 2005. 79 p. Dissertação de mestrado – Centro de Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas.

SACHA, A. F. T.; HIJUM, V.; BONTING, K.; MARC, J. E. C.; MAAREL, V. D.; DIJKHUIZEN, L. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. **FEMS Microbiology Letters**, v.205, p.323-328, 2001.

SANKALIA, J. M.; SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C. Drug release and swelling kinetics of directly compressed glipizide sustained-release matrices: Establishment of level A IVIVC. **Journal of Controlled Release**, v.129, p.49–58, 2008.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N. F. F.; NÓBREGA, J. E.; JÚNIOR, M. A. W.; BARBOSA, K. B. F.; VOLP, A. C. P.; ZERDAS, E. R. M. A.; W. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v.20, p.85-89, 2009.

SATTURWAR, P. M.; FULZELE, S. V.; JOSHI, S. B.; DORLE, A. K. Evaluation of the Film-Forming Property of Hydrogenated Rosin. **Drug Dev. Ind. Pharm**, v.29, p.877-844, 2003.

SHAH, A. K.; ASHTAPUTRE, A. A. Evaluation of rheological properties of the exopolysaccharide of *Sphingomonas paucimobilis* GS-1 for application in oil exploration. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.442–445, 1999.

SHAH, V.; RAY, A.; GARG, N.; MADAMWAR, D. Characterization of the Extracellular Polysaccharide Produced by a Marine Cyanobacterium, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, and Its Exploitation Toward Metal Removal from Solutions. **Current Microbiology**, v. 40, p. 274–278, 2000.

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.

SIMMS, P. J.; BOYKO, W. J.; EDWARDS, J. R. The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. **Carbohydrate Research**, v.208, p.193-198, 1990.

SINGH, S.; FETT, W. F. Stimulation of exopolysaccharide production by fluorescent pseudomonads in sucrose media due to dehydration and increased osmolarity. **FEMS Microbiology Letters**, v.130(2-3), p.301-306, 1995.

SINGH, B. N.; TROMBETTA, L. D.; KIM, K. H. Biodegradation behavior of gellan gum in simulated colonic media. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.9(4), p.399-407, 2004.

SINHA, V. R.; MITTAL, B. R.; BHUTANI, K. K.; KUMRIA, R. Colonic drug delivery of 5-fluorouracil: an in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.269, p.101-108, 2004.

SINHA, V. R.; MITTAL, B. R.; KUMRIA, R. In vivo evaluation of time and site of disintegration of polysaccharide tablet prepared for colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.289, p.79–85, 2005.

SIPOS, P.; SZÚCS, M.; SZABÓ, A.; ERŐS, I.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. An assessment of the interactions between diclofenac sodium and ammonio methacrylate copolymer using thermal analysis and Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.46, p.288–294, 2008.



SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. Studies on succinate tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochemistry Biophysics Acta**, v.77, p.383-393, 1963.

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

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

TAKAHAMA, A.; KUZE, J.; OKANO, S. Production of Lactosucrose by *Bacillus natto* levansucrase and some properties of the enzyme. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v.38(9), p. 789-796, 1991.

TANAKA, K. Production of a Non-reducing Fructotrisaccharide from Levan in the Culture of *Arthrobacter ureafaciens*. **Agric. Biol. Chem.**, v.53(8), p.2275-2276, 1989.

TARANTILI, P. A.; KOUMOULOS, H. Sustained release of guaifenesin and ipriflavone from biodegradable coatings. **European Polymer Journal**, v.44, p.444-452, 2008.

TIRTAATMADJA, V.; DUNSTAN, D. E.; BOGER, D. V. Rheology of dextran solutions. **J. Non-Newtonian Fluid Mech.**, v.97, p.295-301, 2001.

TONG, Q.; XIAO, Q.; LIM, L. T. Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. **Food Research International**, v.41, p.1007-1014, 2008.

TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, v.8, p.692-700, 2003.

UGHINI, F.; ANDREAZZA, I. F.; GANTER, J. L. M. S.; BRESOLIN, T. M. B. Evaluation of xanthan and highly substituted galactomannan from *M. scabrella* as a sustained release matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, v.271 p. 197-205, 2004.

USP NF. 23. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p.2056.

VARDAKOU, M.; PALOP, C. N.; GASSON, M.; NARBAD, A.; CHRISTAKOPOULOS, P. In vitro three-stage continuous fermentation of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity by the gut microflora. **International Journal of Biological Macromolecules**, artigo em prensa, 2007.

VARSHOSAZ, J.; EMAMI, J.; TAVAKOLI, N.; FASSIHI, A.; MINAIYAN, M.; AHMADI, F.; DORKOOSH, F. Synthesis and evaluation of dextran-budesonide conjugates as colon specific prodrugs for treatment of ulcerative colitis. **International Journal of Pharmaceutics**, no prelo, 2008.

VIÑARTA, S. C.; MOLINA, O. E.; FIGUEROA, L. I. C.; FARIÑA, J. I. A further insight into the practical applications of exopolysaccharides from *Sclerotium rolfsii*. **Food Hydrocolloids**, v.20, p.619-629, 2006.

WEI, H.; LI-FANG, F.; BAI, X.; CHUN-LEI, L.; QING, D.; YOUNG-ZHEN, C.; DE-YING, C. An investigation into the characteristics of chitosan/Kollicoat SR30D free films for colonic drug delivery. **Eur. J. Pharm. Sci**, v.72(1), p. 266-274, 2009.

WEI, H.; QING, D.; DE – YING, C.; BAI, X.; LI – FANG, F. Study on colon-specific pectin/ethylcellulose film-coated 5-fluorouracil pellets in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v.348, p.35-45, 2008.

WU, C. Y.; MAU, J. L.; LIANG, Z. C. The influence of cultivation conditions on mycelial growth and exopolysaccharide production of culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus citrinopileatus* Singer (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.10(3), p.279-292, 2008.

YAMAMOTO, S.; IIZUKA, M.; TANAKA, T.; YAMAMOTO, T. The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* levansucrase. **Agric. Biol. Chem**, v.49(2), p.343-349, 1985.

YE, ZHI-WEI; ROMBOUT, P.; REMON, J. P.; VERVAET, C.; MOOTER, G. V. D. Correlation between the permeability of metoprolol tartrate through plasticized isolated ethylcellulose/hydroxypropyl methylcellulose films and drug release from reservoir pellets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, V.67, p. 485-490, 2007.

YIM, J. H.; KIM, S. J.; AHN, S. H.; LEE, H. K. Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. **Bioresource Technology**, v.98, p.361–367, 2007.

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.

ZENKIEWICZ, M.; RICHERT, J. Permeability of polylactide nanocomposite films for water vapour, oxygen and carbon dioxide. **Polymer Testing**, v.27, p.835–840, 2008.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

Relatório Técnico: Identificação de microrganismos - coleção de culturas tropicais –  
André Tosello – Campinas, SP

### Relatório Técnico

|   |  |
|---|--|
| <b>Serviço:</b> Identificação de microrganismos       | <b>Relatório:</b> 080120rf                 |
| <b>Interessado:</b> Universidade Estadual de Londrina | <b>Data de Recebimento:</b> 16/10/2008     |
| <b>Serviço No.</b>                                    | <b>Amostra</b>                             |
| 080120-1  | Amostra : <i>Bacillus</i> Isolado do Natto |

#### 1. Objetivos:

Identificação de microrganismos por taxonomia convencional.

#### 2. Metodologia utilizada:

- **Identificação de bactérias por Taxonomia clássica convencional.**

Avaliação de características fisiológicas e metabolismo bioquímico pela taxonomia clássica convencional, associada o sistema de testes rápidos de identificação.

A Identificação é baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados das espécies de referência descritas na literatura.

#### 3. Resultados:

| Serviço No. | Amostra                                    | Resultados   |
|-------------|--|--|
| 080120-1    | Amostra : <i>Bacillus</i> Isolado do Natto | <i>Bacillus subtilis</i> ; (Ehrenberg 1835)<br>Cohn 1872 |

#### 4. Bibliografia:

DSMZ - **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen** disponível em:  
<http://www.dsmz.de/>

Gordon, R.E.; Haynes, W.C. and Pang, C.Hor-Nay. **The Genus *Bacillus***. Agriculture Handbook Nº 427. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, 1973.

Holt J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.<sup>a</sup>, Stanley J.T., Williams, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9<sup>th</sup> ed. The Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

Sneath, P.H.<sup>a</sup> Endospore-forming Gram positive rods and cocci. In: Sneath P.H.<sup>a</sup>; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. and Holt, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. **Vol.2**,.

Slepecky, R.<sup>a</sup> and Hemphill, H.E. The genus *Bacillus* – Nonmedical. In: Ballows, A; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W. and Schleifer, K.H. (Ed.) **The Prokaryotes**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 1992. **Vol.II**

**Observações:**

As análises foram realizadas nos laboratórios da Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello.

Os resultados têm significação restrita e se aplicam somente às culturas recebidas para análise.

As culturas serão mantidas em nosso laboratório por um período de um mês a partir desta data. Após este período elas serão descartadas.

|                    |   |
|--------------------|---|
| Data               | Emitido por   |
| <b>07/Nov/2008</b> | <b>Aline de Souza Lopes</b><br><b>Identificações/Testes e Ensaios - CCT/FAT</b> |

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

No. SERVIÇO:

**Tabela Bacillus**

|                 |      |
|-----------------|------|
| Meio de cultura | NA   |
| Temperatura     | 35°C |

| Característica da Colônia |           | Característica da Célula  |                       |
|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------------------|
| Cor                       | Creme     | Forma                     | Bastonete             |
| Forma                     | Irregular | Gram                      | Positivo              |
| Margem                    | Irregular | Rearranjo                 | Isolado e aos pares   |
| Superfície                | Plana     | Presença de Esporos       | Sim                   |
| Textura                   | Friável   | Forma do Esporo           | Elipsoidal            |
| Brilho/Opacidade          | Opaca     | Local onde esta na célula | Central e subterminal |
|                           |           | Móveis                    | sim                   |
|                           |           | Requerimento de Oxigênio  | Aeróbico              |

| Testes Preliminares                  |                   |                       |   |
|--------------------------------------|-------------------|-----------------------|---|
| Catalase                             | +                 | Citrato               | + |
| Oxidase                              | -                 | Uréia                 | - |
| Indol                                | -                 | Hidrolise de Arginina | - |
| Redução de Nitrato                   | +                 | Hidrolise de Lisina   | - |
| Metabolismo fermentativo e oxidativo | Inerte            | Hidrolise de Ornitina | - |
| Crescimento a 30°C                   | +                 | Propionato            | + |
| Crescimento a 37°C                   | +                 | Esculina              | + |
| Crescimento a 50°C                   | +                 | Fenilalanina          | - |
| TSI                                  | Acidifica glicose | Voges Proskauer       | + |
| H <sub>2</sub> S                     | -                 | Amido                 | + |
| Tirosina                             | -                 | Gelatina              | + |
| Crescimento em pH5,7 - SDA           | +                 |                       |   |

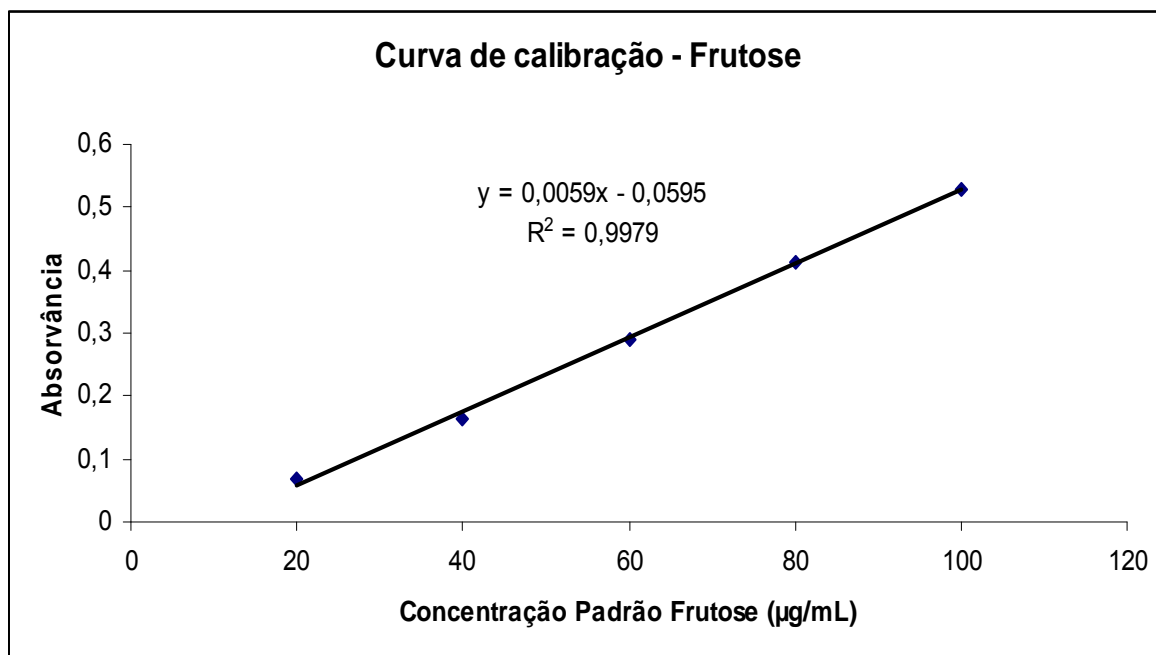
| Vitek                        |   |                                 | API |                                    |   |                                    |   |                                   |   |
|------------------------------|---|---------------------------------|-----|------------------------------------|---|------------------------------------|---|-----------------------------------|---|
| SUC – sacarose               | + | TRE – trealose                  | +   | GLY – glicerol                     | + | INO – inositol                     | + | INU – inulina                     | + |
| TZR – vermelho de tetrazólio | - | PLA – palatinosio               | +   | ERY – eritritol                    | - | MAN – D-manitol                    | + | MLZ – D-melezitose                | - |
| TAG – tagatose               | - | SOR – sorbitol                  | +   | DARA – D-arabinose                 | - | SOR – D-sorbitol                   | + | RAF – D-rafinoose                 | - |
| GLU – glicose                | + | NAG – N-acetil-D-glucosamina    | +   | LARA – L-arabinose                 | + | MDM – metil-alfa-D-manopiranosido  | - | AMD – amido                       | + |
| INO- inositol                | - | AMY – amilopectina              | +   | RIB- D-ribose                      | + | MDG – metil-alfa-D-glucopiranosido | + | GLYG – glicogénio                 | - |
| GAL – galactose              | - | KCN- tiocianato de potássio     | +   | DXYL – D-xilose                    | - | NAG – N-acetil-glucosamina         | - | XLT - xilitol                     | - |
| ARA – arabinose              | + | NCL – cloreto de sódio 7%       | +   | LXYL – L-xilose                    | - | AMY – amigdalina                   | - | GEN – gentiobiose                 | - |
| XYL – xilose                 | - | MEN – ácido mandélico           | +   | ADO – D- adonitol                  | - | ARB – arbitina                     | - | TUR – D-turanose                  | + |
| MAN – manitol                | + | OLD – oleandomicina             | -   | MDX – metil-beta-D-xilopiranosidio | - | ESC – esculina citrato de ferro    | + | LYX – D-lixose                    | - |
| RAF – rafinoose              | - | NAA – acetato de sódio          | +   | GAL – D-galactose                  | - | SAL – salicina                     | - | TAG – D-tagatose                  | - |
| SAL – salicina               | - | ARB – arabitól                  | -   | GLU – D-glicose                    | + | CEL – D-celibiose                  | - | DFUC – D-fucose                   | - |
| AGA – amigdalina             | - | PAS – poliamido-higroestreptina | +   | FRU – D- frutose                   | + | MAL – D-maltose                    | + | LFUC – L-fucose                   | - |
| INU – inulina                | + | NAE – ácido nalidíxico          | -   | MNE – D-manose                     | + | LAC – D-lactose (origem bovina)    | - | DARL – D-arabitól                 | - |
| RIB – ribose                 | - | ESC – esculina                  | +   | SBE – L-sorbose                    | - | MEL – D-melibiose                  | - | LARL – L-arabitól                 | - |
| MLT – maltose                | + | THRM –termófilo                 | -   | RHA – L-raminose                   | - | SAC – D-sacarose                   | + | GNT – glucanato de potássio       | - |
|                              |   |                                 |     | DUL – dulcitol                     | - | TER – D-trealose                   | + | 2KG – 2-cetoglucanato de potássio | - |
|                              |   |                                 |     |                                    |   |                                    |   | 5KG – 5-cetoglucanato de potássio | - |

### Resultado da identificação

Identificação foi realizada com testes bioquímicos, sistema de identificação Vitek (porcentagem de identificação de 81%), API (porcentagem de identificação de 98,3%) e comparação com a literatura, resultando: **Bacillus subtilis**

## ANEXO B

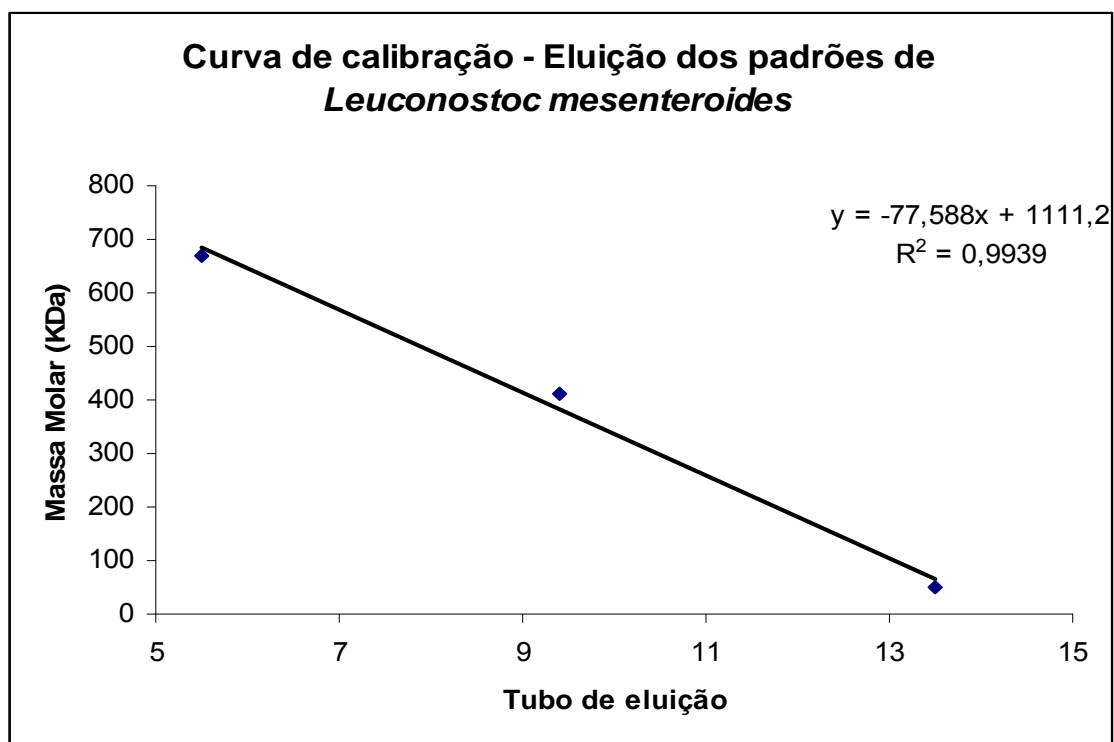
Curva de Calibração da Solução Padrão de Frutose por Somogyi (1954) e Nelson (1944) em 540 nm





## ANEXO C

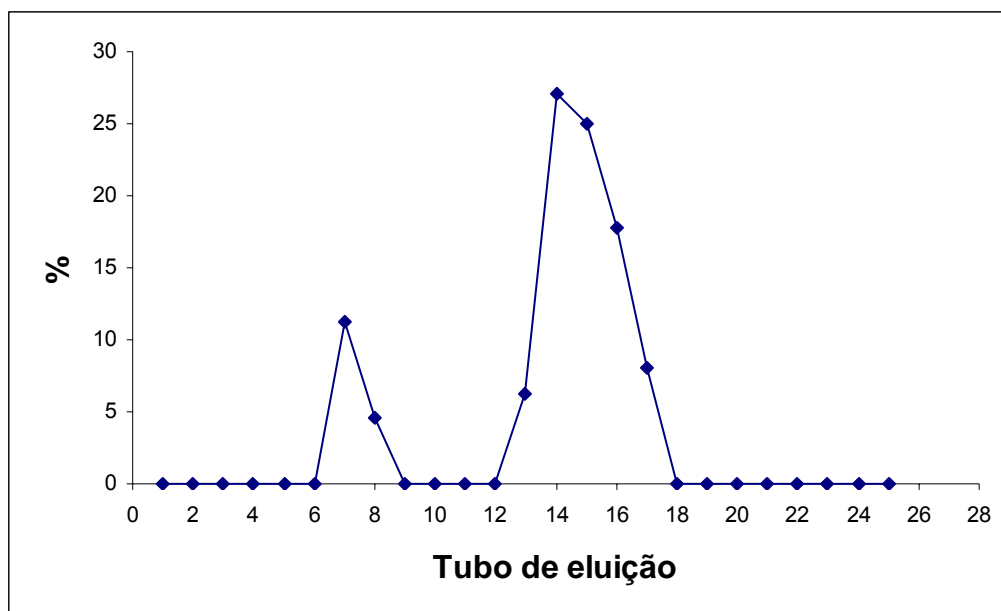
Curva de Calibração da Cromatografia de Exclusão Molecular com Padrões de *Leuconostoc mesenteroides* Sigma de 50.000, 410.000 e 670.000 Da



## ANEXO D

## Perfil de eluição da amostra

A amostra de levana obtida da condição ideal, determinada pelo delineamento fatorial e metodologia de superfície de resposta, foi precipitada, liofilizada e submetida à cromatografia de permeação em gel. Os açúcares totais foram medidos pelo método de fenol-sulfúrico e estão em porcentagem sobre o total de açúcares eluídos. Cada tubo de eluição corresponde a 3,5 mL/15'.



**Figura** – Perfil cromatográfico da amostra de levana obtida

## ANEXO E

### Instruções e normas para o encaminhamento e publicação do Artigo no periódico Food Microbiology

#### Guide for Authors

Original research papers for *Food Microbiology* should be written in English and normally not exceed 6000 words. Short **research notes** describing interesting but limited studies are welcome, but the same rigorous review process will be applied. Short research notes will not normally exceed 3500 words. Short **reviews** on matters of immediate interest and longer, definitive reviews will be published; authors should discuss proposed topics with the editor before preparing a manuscript. **Book reviews** and **letters to the editor** are welcome.

#### Submission of Papers

Submission for all types of manuscripts to *Food Microbiology* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal, <http://ees.elsevier.com/fm>, you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files. When submitting a manuscript via EES, authors need to provide an electronic version of their manuscript. For this purpose only original source files are allowed, so PDF files are not permitted. Once the uploading is done, the system automatically generates an electronic proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be by e-mail. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com).

Questions regarding content of a proposed submission may be sent to the Chief Editor:

M.L. Tortorello  
US Food and Drug Administration  
National Center for Food Safety and Technology  
6502 S. Archer Road  
Summit-Argo, IL 60501, USA  
Fax: +1(708) 728 4177  
E-mail: [mlt@cfsan.fda.gov](mailto:mlt@cfsan.fda.gov)

It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. Language Polishing: For authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or

services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions.

All papers will be independently refereed.

Submission of a paper implies that it has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

### **Preparation of Manuscripts**

Manuscripts should be typewritten, double spaced, with one-inch (2.5 cm) margins. A font size of 12 or 10 pt is required. Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers. Lines must be numbered consecutively throughout the manuscript. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote, and must provide an e-mail address for correspondence. Full postal addresses must be given for all co-authors. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the necessary title exceeds 40 characters, a suggestion for an abbreviated running title should be given.

The first page should contain only the title, names of authors, address of laboratory where the work originated, full postal address to which correspondence should be sent, a running title if necessary, and current addresses of authors if different from the above correspondence address.

The second page should contain the summary/abstract only, which will not normally exceed 200 words. The text of the paper should normally follow the sequence: Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Legends to Figures. In appropriate cases (e.g. Short Notes), Results and Discussion sections may be combined.

*References* in text should be cited as follows: Hobson and Wallace (1969) or (Hobson and Wallace 1959). If a paper has more than two authors, use the form (Hobson et al. 1963). When more than one paper by the same author is cited in a given year, the references should be distinguished in the bibliography and the text by letters a, b, etc. after the year citation (e.g. 1963a, 1963b, 1963a,b). References in the bibliography at the end of the paper should be quoted in alphabetical order, except for those with more than two authors, which should be listed in chronological order after any other papers by the first author. References should include the title of the paper as well as both initial and final page numbers. References to books should include the year of publication, the title, town of publication and publisher.

The following formats should be used:

Baresi, L., Mah, R. A., Ward, D. M. and Kaplan, I. R., 1978. Methanogenesis from acetate: enrichment

studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 186-197.

Mah, R. A., Hungate, R. E. and Ohwaki, K., 1977a. Acetate, a key intermediate in methanogenesis. In: Schlegel, H.G., Barnea, J. (Eds.), *Microbial energy conversion*. Pergamon Press, Oxford, pp. 97-106.

### **Abbreviations and Units**

Non-standard abbreviations should be kept to a minimum and on first use should be defined by a footnote to the text. SI units are recommended, but conventional ones will be accepted if unambiguous.

### **Nomenclature and Descriptions of Organisms**

The correct name of the organism must be used, conforming with international rules of nomenclature: synonyms may be added in brackets when the name is first mentioned. Names of bacteria must conform with the current Bacteriological Code of Botanical Nomenclature. The species name should be underlined in the typescript and written in full at first mention, but subsequently the name of the genus may be abbreviated, single letter abbreviations being used where they are not ambiguous. To facilitate further studies the journal supports the view that important strains should be deposited in a recognized culture collection.

### **Tables**

Tables should be indicated with Arabic numerals and should be comprehensible without reference to the text; titles should be brief and explanatory material should be referenced with lower case superior letters and listed in footnotes. Appropriate indications of replication and variability should be included. Each table should occupy a separate sheet in the manuscript.

### **Illustrations**

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered in Arabic numbers consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

#### *Preparation of electronic illustrations*

##### 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, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkguidelines> You are urged to visit this site.

### **Supplementary material submission**

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published on-line 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 ensure that data are provided 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 the Author Gateway at <http://www.elsevier.com/artworkguidelines>

### **. Proofs**

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted. Return proofs by e-mail to [proofcorrections@elsevier.com](mailto:proofcorrections@elsevier.com).

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. 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. If colour is paid for within an article then 100 extra offprints will be supplied at no extra charge.

Additional offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders for reprints (produced after publication of an article) will incur a 50% surcharge.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://www.elsevier.com/authorsrights>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier, Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford, OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)

**Author Enquiries** A submission checklist can be found at <http://www.elsevier.com/locate/guidepublication>. Register for free to receive email updates from the article tracking service at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. If you are interested in submitting a book in this area go to <http://www.elsevier.com/bookauthors>. Do not contact the editors - they do not have access to this information. Food Microbiology carries no page charges.

## ANEXO F

### Instruções e normas para o encaminhamento e publicação do Artigo no periódico Applied Microbiology and Biotechnology e World Journal of Microbiology and Biotechnology

## Aims and scope - Applied Microbiology and Biotechnology

The journal publishes two categories of articles: (i) Original Papers (preferred length of 6-8 printed pages), (ii) Mini-Reviews (preferred length of 5-6 printed pages).

Mini-Reviews are short reviews critically summarizing the current state of and providing perspectives on biotechnological processes, products, microbial genomes, methods and equipment.

Papers should deal with the following aspects of applied microbiology and biotechnology:

#### Biotechnological products and process engineering

Established and in pipe technologies of biotechnological processes using prokaryotic or eukaryotic cells or enzymes and other proteins for production, conversion, degradation and detection of substances including bioreactor design.

#### Biotechnologically relevant enzymes and proteins

Characterization of hitherto undescribed, biotechnologically relevant enzymes and proteins or of known proteins with novel properties and purification of proteins on a technical scale.

#### Applied genetics and molecular biotechnology

New vectors and methods for genetic transformation and all aspects of strain improvement employing recombinant DNA technology including metabolic engineering and enzyme engineering.

#### Genomics and proteomics

Characterization and analyses of genomes, transcriptomes and proteomes.

#### Applied microbial and cell physiology

Physiological studies on biosynthesis, catabolism and biotransformation of biotechnologically relevant compounds.

#### Environmental biotechnology

All aspects of environmental processes using microorganisms and biodegradation of hazardous chemicals.

#### Methods

Novel methods and techniques or significant modifications of already described methods. Their novelty and reliability must be concisely presented.

## Aims and scope - World Journal of Microbiology and Biotechnology

World Journal of Microbiology & Biotechnology publishes research papers, short communications, technical communications and review articles on all aspects of applied microbiology and biotechnology. Virological topics however are outside the scope of the journal. The Journal provides a forum for research work directed towards microbiological and biotechnological solutions to global problems encouraging contributions from all scientists from all across the globe who have an interest in tackling them. As many global issues, for example improving



crop productivity, public health and waste management, have more acute consequences in the developing world, the Journal emphasizes the role of biotechnological advances, for and from developing regions.

Short Communications should not normally exceed four printed pages (about 2000 words) which may include up to three figures and/or tables, and no more than 20 references. Technical communications should consist of descriptions of new or modified techniques with examples of their application and should not exceed three printed pages.

The Journal also publishes selected review articles on the social and educational aspects of biotechnology and its applications if these address relevant policy or scientific issues or novel pedagogical practices. In addition, topical Commentaries, often derived from significant scientific meetings are published. Typically, these are commissioned, but suggestions will be considered upon communication with the appropriate Editor. All articles published in the Journal are independently refereed.

## Manuscript submission

### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

## Title Page

### Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author
- 

### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

# Text

## Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
- Save your file in doc format. Do not submit docx files.
- 

Word template

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.  
LaTeX macro package

## Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

## Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

# References

## Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

## Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

### Journal article

- Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

### Article by DOI

- Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

### Book

- South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

### Book chapter

- Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

### Online document

- Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

### Dissertation

- Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)

## Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.



For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.



- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## Languages

Articles and abstracts must be in English or in the journal's official language(s), but the journal accepts additional abstracts in other languages of the author's choice (for instance in the author's first language, if not English or the journal's official language). Such abstracts are optional. Authors would need to supply such abstracts themselves, certify that they are a faithful translation of the official abstract, and they must be supplied in Unicode (see [www.unicode.org](http://www.unicode.org) for details), especially if they are using non-roman characters.

<http://www.unicode.org>

Such abstracts in other languages will carry a disclaimer:

"This abstract is provided by the author(s), and is for convenience of the users only. The author certifies that the translation faithfully represents the official version in the language of the journal, which is the published Abstract of record and is the only Abstract to be used for reference and citation."