
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE DE *L. mesenteroides* FT045B,
PRODUÇÃO DE DEXTRANA DE MASSA MOLAR MÉDIA
CONTROLADA, PRODUÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO α -GLICOSÍDEO E
DO COMPOSTO BROMO-DEXTRANA.**

MARY HELEN PALMUTI BRAGA VETTORI



Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro;
Universidade Estadual Paulista “Julio
de Mesquita Filho” – Campus Rio
Claro, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas, área de
Microbiologia Aplicada (Microbiologia
Aplicada)

Rio Claro
2014

**PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE DE *L.*
mesenteroides FT045B, PRODUÇÃO DE DEXTRANA DE
MASSA MOLAR MÉDIA CONTROLADA, PRODUÇÃO DE
ÁCIDO ASCÓRBICO α -GLICOSÍDEO E DO COMPOSTO
BROMO-DEXTRANA.**

MARY HELEN PALMUTI BRAGA VETTORI

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Rio Claro
2014

**PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE DE *L.*
mesenteroides FT045B, PRODUÇÃO DE DEXTRANA DE
MASSA MOLAR MÉDIA CONTROLADA, PRODUÇÃO DE
ÁCIDO ASCÓRBICO α -GLICOSÍDEO E DO COMPOSTO
BROMO-DEXTRANA.**

MARY HELEN PALMUTI BRAGA VETTORI

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Jonas Contiero

Prof. Dr. Rubens Monti

Profa. Dra. Heloiza Ferreira Alves do Prado

Profa. Sandra Helena da Cruz

Profa. Eliana Setsuko Kamimura

Rio Claro, 07 de novembro de 2014.

547.758 Vettori, Mary Helen Palmuti Braga
V592p Purificação da dextranasacarase de *L. mesenteroides* FT045B, produção de dextrana de massa molar média controlada, produção de ácido ascórbico alfa-glicosídeo e do composto bromo-dextrana / Mary Helen Palmuti Braga Vettori. - Rio Claro, 2014
145 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero

1. Enzimas. 2. Aplicações tecnológicas. 3. Veículo de drogas. 4. Acetobromação. 5. Epilepsia. 6. Vitamina C. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE RIO CLARO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

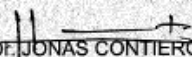
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE DE *L. MESENTEROIDES* FT045B, PRODUÇÃO DE DEXTRANA DE MASSA MOLAR MÉDIA CONTROLADA, PRODUÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO α -GLICOSÍDEO E DO COMPOSTO BROMO-DEXTRANA

AUTORA: MARY HELEN PALMUTI BRAGA VETTORI

ORIENTADOR: Prof. Dr. JONAS CONTIERO

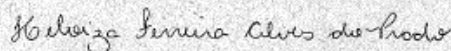
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JONAS CONTIERO

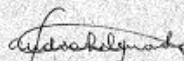
Campus de Rio Claro - Ib / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. RUBENS MONTI

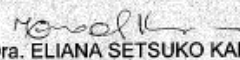
Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas


Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Profa. Dra. SANDRA HELENA DA CRUZ

Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Usp


Profa. Dra. ELIANA SETSUKO KAMIMURA

Departamento De / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga

Data da realização: 07 de novembro de 2014.

Dedicatória

Ter uma pessoa deficiente em casa não é uma aventura emocionante e bem humorada com se vê em filmes, novelas e reportagens. Na verdade, para se conviver com alguém especial é preciso tornar-se também especial, coisa difícil, principalmente para uma criança que quer desfrutar de liberdade e é sempre impedida, pois tem que orbitar no mundo de alguém que não sabe o que quer e não gosta de nada.

Vivi uma infância solitária e silenciosa dividindo a atenção de meus pais com meu irmão autista que absorvia quase toda a atenção e cuidados deles. Aos 9 anos de idade recebi de braços abertos meus dois irmãos adotivos de 3 e 5 anos de idade que trouxeram alegria e colorido a minha infância reprimida; agora éramos em número maior capaz de driblar o gênio intempestivo de nosso irmão.

Certo dia, presenciei uma crise de convulsão em meu irmão que me deixou estarecida. Estava acostumada à sua agressividade e acessos de raiva intermináveis, mas nada tão ameaçador à sua vida. Fiquei abalada! Compreendi que também ele era refém de algo que o dominava tirando todas as suas forças e me senti culpada pelas vezes em que desejei não conviver com ele. Porque agora eu podia entender que era uma pessoa privilegiada por não ter tido Epilepsia e por isso responsável por tentar minimizar o sofrimento de outras famílias que como nós, tinham sido contempladas com esta experiência.

Fico feliz em dizer que meu irmão, adotado aos 5 anos de idade, faz hoje, seu Doutorado em Neurociências na Universidade Federal de São João Del Rei, também buscando ajudar nos estudos da Epilepsia.

E agora falando de coisas boas...

Dedico esta conquista a minha pequena **Sofia**,
que nasceu junto com este doutorado,
E ao meu amor.

Agradecimentos

Agradeço a todos que me ajudaram a concluir este trabalho, começando pelo Prof. Dr. Jonas Contiero que me apoiou e confiou nas minhas decisões, sempre disposto a orientar e ajudar a buscar recursos necessários. Agradeço também à Fapesp, pelo apoio financeiro, que sem ele não seria possível desenvolver os experimentos.

Agradeço também às minhas estagiárias e aos colaboradores, que dispuseram de tempo e recursos.

E por último, mas não menos importante, agradeço aos meus colegas de trabalho, que de alguma forma cooperaram com amizade, alegria e bom humor.

RESUMO

O presente estudo foi desenvolvido sobre aplicações tecnológicas da dextrana produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. Para que fosse possível trabalhar com a enzima, desenvolveu-se metodologia para purificação com polietilenoglicol (PEG), seguida de filtração em gel cromatográfico. Após análise por SDS-PAGE, foi constatado que a enzima dextranasacarase FT045B apresenta massa molar de aproximadamente 136 kDa. Resultados obtidos pela análise de variância (ANOVA) mostraram que o experimento com 10% de PEG 1500 e 20% de PEG 4000 apresentou melhor purificação da enzima dextranasacarase. Foi confirmado que a enzima dextranasacarase purificada é uma glicosiltransferase e não uma frutossiltransferase, pela análise de atividade em gel de acrilamida sob condições não denaturantes. O ácido ascórbico α -glicosídeo foi sintetizado, pela reação de transglicosilação catalisada pela dextranasacarase previamente purificada, e estruturalmente caracterizado após purificação, por espectrofotômetro de massas. Também com a dextranasacarase purificada, foi realizado um delineamento composto central para otimizar as condições de temperatura, concentração de sacarose e atividade enzimática para a produção de dextrana de massa molar controlada, sendo que o ponto ótimo obtido foi estabelecido em 4,27% de Tween 80 e 1,83g de agitação. O composto, Bromo-dextrana, foi sintetizado pela reação de acetobromação de dextrana, seguido de purificação com etanol, secagem e identificação.

ABSTRACT

Development on technological applications of dextran produced by the bacterium *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. Enzyme dextransucrase was purified with polyethyleneglycol (PEG), followed by gel filtration chromatography. After analysis by SDS-PAGE revealed that the enzyme presents dextransucrase FT045B molar mass of approximately 136 kDa. Results obtained by analysis of variance (ANOVA) showed that the experiment with 10% PEG 1500 and 20% PEG 4000 showed better dextransucrase enzyme purification. It was confirmed that the purified enzyme is a glycosyltransferase, but not a fructosyltransferase by activity on acrylamide gel under non denaturants conditions. The α -glycoside ascorbic acid was synthesized by transglycosylation reaction catalyzed by dextransucrase previously purified, and structurally characterized after purification by mass spectrometer ESI-MS. A central compositio design was also purified with dextransucrase performed to optimize the conditions of temperature, concentration and enzyme activity of sucrose to produce dextran of molecular weight controlled, and the optimal point obtained was set at 4.27% Tween 80 and 1,83g of agitation. The compound Bromo-dextran was synthesized by the reaction of acetylation followed by bromation of dextran, and purification with ethanol, drying and identification.

SUMÁRIO

Pagina

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	15
3. PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE	17
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1.1 DEXTRANA	17
3.1.2 PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE	17
3.1.3 PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE POR PRECIPITAÇÃO COM POLIETILENO GLICOL	18
3.1.4 CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL	19
3.1.5 ESTIMATIVA DA MASSA MOLAR DA PROTEÍNA	24
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.2.1 ORGANISMO	25
3.2.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA	25
3.2.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	25
3.2.4 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA	27
3.2.5 PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASE POR FRACIONAMENTO COM PEG	27
3.2.6 DIÁLISE	29
3.2.7 ANÁLISE DA ENZIMA PURIFICADA POR SDS-PAGE	30
3.2.8 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DA DEXTRANASACARASE UTILIZANDO GEL DE CONCENTRAÇÃO UNIFORME	30
3.2.9 IDENTIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE POR ATIVIDADE DAS BANDAS RESULTANTES	31
3.2.10 PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE POR CROMATOGRAFIA EM FILTRAÇÃO EM GEL	31
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
3.3.1 PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE COM PEG 1500 E PEG 4000	33
3.4 CONCLUSÃO	46
4. PRODUÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO A-GLICOSÍDEO	48
4.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	49
4.1.1 VITAMINA C	49
4.1.2 FUNÇÕES E APLICAÇÕES DO AA-2G	53
4.1.3 PRODUÇÃO DE AA-2G POR BIOTRANSFORMAÇÃO	55
4.1.4 REAÇÃO ACCEPTOR COM A DEXTRANASACARASE: PARA ENTENDER MELHOR A REAÇÃO DE TRANSGLICOSILAÇÃO DE FORMAÇÃO DO AA-2G	59
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.2.1 REAÇÃO DE TRANSGLICOSILAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE AA-2G	63
4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DO COMPOSTO AA-2G POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	63
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.4 CONCLUSÃO	69
5. OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA	70
5.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	71
5.1.1 DEXTRANA: ESTRUTURA	71

5.1.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DOS TAMANHOS MOLECULARES DAS DEXTRANAS.	72
5.1.3 PRODUÇÃO DE DEXTRANA COM MASSA MOLAR CONTROLADA	73
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	78
5.2.1 USO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL PARA O ESTUDO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANA DE MASSA MOLAR CONTROLADA	78
5.2.2 REAÇÃO ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE DEXTRANA	79
5.2.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR MÉDIA	80
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	81
5.4 CONCLUSÃO	89
 6. PRODUÇÃO DO COMPOSTO BROMO-DEXTRANA	 90
 6.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 90
6.1.1 EPILEPSIA	90
6.1.2 FÁRMACOS ANTICONVULSIVOS	93
6.1.3 BROMETOS	95
6.1.4 BROMETO DE POTÁSSIO	97
6.1.5 EFEITOS COLATERAIS DO BROMETO DE POTÁSSIO	99
6.1.6 MECANISMO DE AÇÃO	100
6.1.7 O USO DE DEXTRANA COMO VEÍCULO DE DROGAS	101
6.1.8 LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS	104
6.1.9 ESTOCAGEM	107
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	108
6.2.1 HIDRÓLISE ÁCIDA DA DEXTRANA	108
6.2.2 ACETOBROMAÇÃO DA DEXTRANA	108
6.2.3 PROCEDIMENTO DE ACETILAÇÃO DA DEXTRANA	109
6.2.4 BROMAÇÃO DA DEXTRANA ACETILADA	110
6.2.5 ESPECTROSCOPIA DE ^1H NMR	110
6.2.6 OTIMIZAÇÃO DA ROTA DE SÍNTESE DO COMPOSTO BROMO-DEXTRANA	111
6.2.7 ANÁLISE DE ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	112
6.2.8 ANÁLISE QUALITATIVA QUANTO À PRESENÇA DE BROMO LIGADO À DEXTRANA.	112
6.2.9 ANÁLISE QUANTITATIVA DE BROMETO	112
6.2.10 SOLUÇÃO DE PERMANGANATO DE POTÁSSIO (0,04M)	113
6.2.11 SOLUÇÃO IODETO DE POTÁSSIO/ÁCIDO SULFÚRICO	113
6.2.12 SOLUÇÃO PADRÃO DE BROMETO DE POTÁSSIO	113
6.2.13 PROCEDIMENTO ANALÍTICO	113
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	115
6.3.1 HIDRÓLISE ÁCIDA DA DEXTRANA	115
6.3.2 ACETILAÇÃO DA DEXTRANA	117
6.3.3 ACETILAÇÃO DA DEXTRANA, USANDO IODO COMO CATALISADOR	118
6.3.4 ANÁLISE POR FTIR	119
6.3.5 BROMAÇÃO DA DEXTRANA ACETILADA	122
6.3.6 ANÁLISE QUALITATIVA QUANTO À PRESENÇA DE BROMO LIGADO À DEXTRANA.	124
6.4 CONCLUSÃO	126
 7. REFERÊNCIAS	 127

1. INTRODUÇÃO

A dextranasacarase FT 045B é produzida por uma nova linhagem de *Leuconostoc mesenteroides* identificada recentemente pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada da Unesp - Campus de Rio Claro e depositada no GenBank, com o nome de FT045B e número de acesso da sequência nucleotídica nuc_1.sqn nuc_1 JF812153.

O processo de produção desta enzima já foi estudado pelo grupo, variando concentrações de compostos do meio. A maior atividade enzimática obtida foi 4,03 IU/mL, utilizando as faixas de 16 a 21,77 g/L de água de maceração de milho, de 32 a 44 g/L de melaço de cana de açúcar e de 26 a 28,41 de K₂HPO₄ em 24h de fermentação.

A dextrana produzida por esta enzima também foi caracterizada por nosso grupo recentemente e apresentou propriedades interessantes, como baixa massa molar média (91,5 kDa) e estrutura bastante linear com 97,9% de ligações α -(1,6), e 2,1% de ramificações α -(1,3), características importantes que conferem potencial interessante para novas aplicações comerciais.

Purificação da dextranasacarase produzida por *L. mesenteroises* FT 045B

Diversos métodos de purificação já foram padronizados para diferentes dextranasacarases produzidas por diversas linhagens, como ultra-filtração, fracionamento com polietileno glicol (PEG), cromatografia, precipitação alcoólica e separação de fases; contudo para este estudo optou-se por trabalhar a enzima com PEG, já que consiste em um procedimento simples e efetivo. Uma vez que este é um polímero hidrofílico e não iônico, e é conhecido por ser eficiente na precipitação seletiva de proteínas com alta massa molar média ou em forma de agregados (a dextranasacarase forma agregados com a própria dextrana produzida), apresenta a vantagem de ser facilmente extraído por diálise, além do fato de que a formação e o equilíbrio do precipitado formado é mais rápido com PEG que com sulfato de amônio ou etanol (DEUTSCHER, 1990; ASENJO, 1990). Russell (1979), Miekka e Ingham

(1978) e Goyal e Katiyar (1994) também mostraram preferência na purificação com PEG.

Produção do composto ácido-ascórbico α -glicosídeo

O ácido ascórbico é um dos antioxidantes mais potentes atuantes nos sistemas biológicos, eliminando compostos ativos oxigenados e radicais livres e tem se mostrado bastante útil na aplicação na pele, contudo é altamente instável quando exposto ao calor, à luz e perde seus efeitos benéficos quando exposto ao ar.

A estratégia deste trabalho para driblar a instabilidade do ácido ascórbico, direcionando a aplicação do novo composto ao uso tópico, seria a realização de reação de transglicosilação enzimática do ácido ascórbico, utilizando um dos mais simples e baratos doadores, a sacarose. A reação de transglicosilação foi catalisada pela dextranasacarase purificada, produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, que catalisa a tão chamada reação aceptor (KIM; ROBYT, 1994), gerando ácido ascórbico α -glicosídeos.

Produção de dextrana clínica

A dextrana produzida com massa molar média controlada apresenta uma gama de aplicações na área alimentícia, farmacêutica e o uso de derivados de dextrana. O método usual para a preparação de dextrana clínica de baixa massa molar média é relativamente ineficiente, uma vez que grande parte da dextrana é quebrada em isomaltodextrinas. É objetivo de vários estudos buscar estratégias para se obter dextrana com massa molar controlada por um processo mais eficaz. O controle das variáveis de produção tem se mostrado o método com maior potencial, apesar da não existência de muitos estudos sobre este tema ainda.

A proposta deste estudo foi desenvolver condições para a produção de dextrana de massa molar controlada.

Produção do composto bromo-dextrana

A dextrana, um condutor macromolecular polissacarídeo desprovido de propriedades seletivas de transporte, pode funcionar como um dos mais promissores candidatos a condutores para uma variedade de agentes terapêuticos devido às suas excelentes propriedades físico-químicas e sua aceitação fisiológica. Os objetivos importantes que devem ser alcançados pela utilização da dextrana como veículo de fármacos incluem melhora do tempo de circulação, estabilização do agente terapêutico, solubilização da droga, redução dos efeitos colaterais, ação de liberação sustentada e propriedades de armazenamento.

Embora o desenvolvimento de conjugados de dextrana esteja apenas no seu início, os resultados de inúmeros artigos tem mostrado certo otimismo acerca da utilização de conjugados de dextrana para atuar como sistema de entrega de drogas no organismo. Nos anos mais recentes, uma grande quantidade de experiências tem sido acumulada nesta área, mas uma série de propriedades deste sistema ainda precisa ser estudada.

O brometo de sódio, fármaco antiepilético de primeira geração, ainda é utilizado para tratar epilepsia refratária em crianças, além de ser amplamente usada em animais. É mais efetivo que o fenobarbital, mais barato e seguro, é excretado intacto por via renal, não sofrendo metabolização hepática, portanto não é hepatotóxico (nenhum relato significativo de toxicidade), não há desenvolvimento de dependência, pode ser usado em associação ao fenobarbital e ser administrado a cada 24 horas. Os sinais de toxicidade são reversíveis com suspensão por 2-3 dias ou em casos severos com fluidoterapia utilizando solução de cloreto de sódio 0,9%. Contudo não está disponível comercialmente, tem que ser manipulado, tem meia vida longa, entre 22 e 38 dias, demora a estabilizar a concentração sérica, atualmente só é possível usar por via oral, leva no mínimo 4 a 6 semanas para atingir nível sérico eficaz, a dieta não pode ser alterada, pois o brometo e o cloreto são íons muito semelhantes, se for utilizada uma dieta com níveis mais altos de sal o brometo será excretado mais rapidamente, causa fraqueza dos membros pélvicos, vômito (doses altas), sedação, polidipsia e poliúria.

O uso do conjugado brometo-dextrana apresenta o potencial de liberação gradual do brometo no organismo do paciente, facilitando o ajuste da dosagem e tornando sua ação de longa duração, diminuindo os efeitos colaterais causados pela super dosagem.

2. OBJETIVOS

Para a purificação da enzima dextranasacarase produzida por *L. mesenteroides* FT045B, a enzima bruta obtida em caldo fermentado isento de células foi submetida a tratamentos com polietilenoglicol (PEG) de massas molares diferentes e em concentrações diferentes; foi centrifugada, dializada e analisada quanto à atividade específica. As frações purificadas nesta etapa passaram novamente pelo mesmo processo 4 vezes e então foram analisadas por SDS-PAGE para detecção das proteínas e da enzima ativa (dextranasacarase) e a atividade foi determinada *in situ* em gel de acrilamida. A fração que apresentou melhor atividade específica após os tratamentos com PEG foi purificada por cromatografia em filtração em gel contendo Sephacryl S-200HR. As frações obtidas foram analisadas quanto à atividade específica, liofilizadas, analisadas por SDS-PAGE e empregadas na produção de ácido ascórbico 2-glicosídeo e na produção de dextrana clínica.

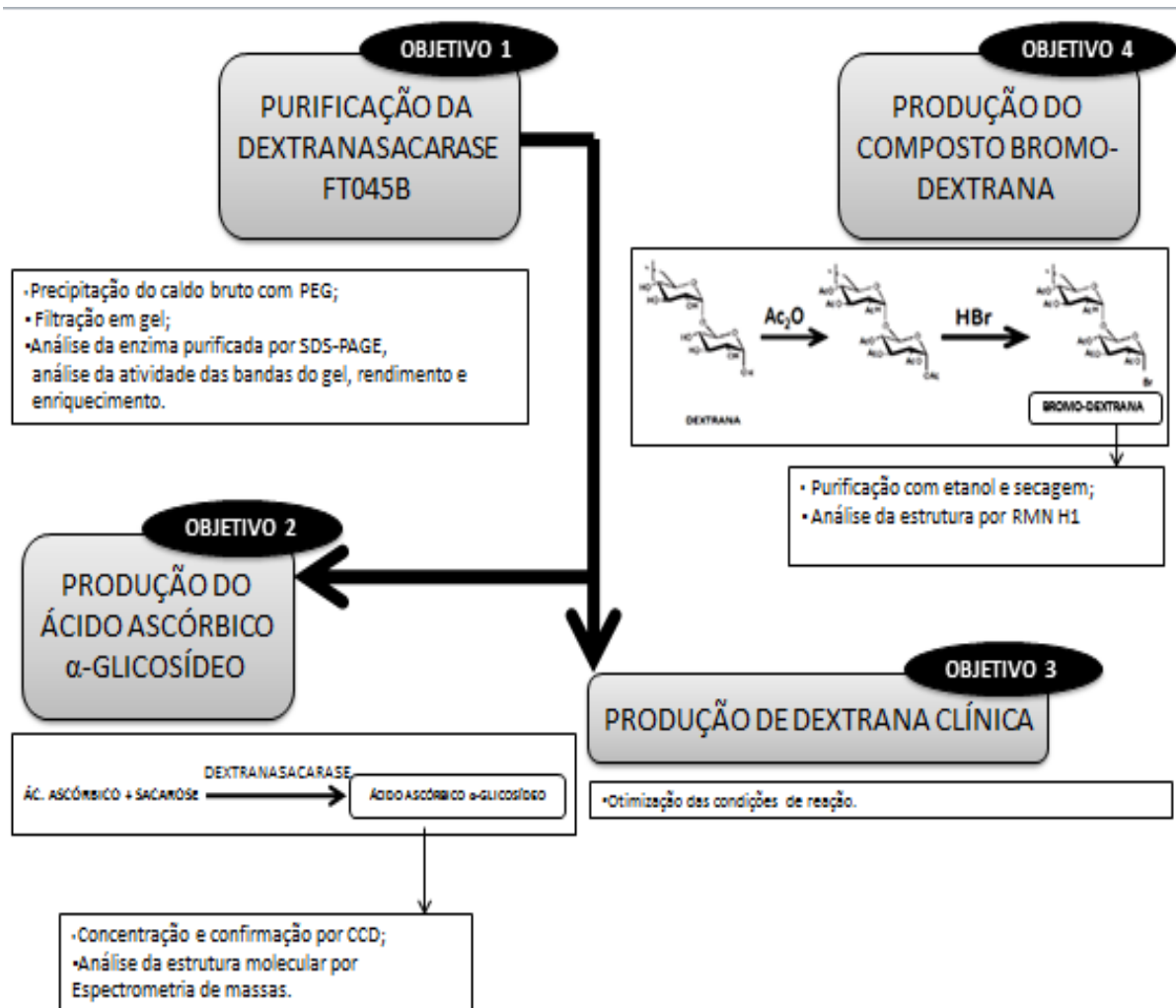
A produção do novo composto ácido ascórbico α -glicosídeo foi conduzida pela reação de transglicosilação catalisada pela dextranasacarase, ou seja, a enzima atuou na formação de oligoglicosídeos em presença de sacarose e de ácido ascórbico como aceptor, formando o composto desejado pela adição do ácido ascórbico no final da cadeia glicosídica. O produto desejado foi previamente purificado com etanol, sendo previamente concentrado em evaporador rotativo, analisado por cromatografia em camada delgada, para prévia confirmação da presença do produto, fracionado e purificado. As frações contendo o ácido ascórbico α -glicosídeo, depois de agrupadas e concentradas foram analisadas por espectrofotômetro de massa ESI-MS para caracterização da estrutura.

Na produção de dextrana de massa molar controlada, foi utilizado um delineamento composto central para otimizar as melhores condições de reação para obtenção de dextrana clínica.

Desenvolveu-se a síntese de um novo composto, Bromo-dextrana, pela reação de acetobromação de dextrana de massa molar baixa (6 kDa). Após a reação, o composto formado foi purificado com etanol, seco e identificado. Após a confirmação da estrutura desejada, o composto poderá ser utilizado em testes

“*in vivo*” para verificação da potencialidade deste composto no tratamento da epilepsia.

Segue esquema para melhor elucidação dos objetivos:



3. PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASACARASE

3.1 Revisão bibliográfica

3.1.1 Dextrana

Dextrana é um nome genérico aplicado a uma larga classe de α -D-glucanas com unidades anidro-D-glicopiranosose compondo sua cadeia principal. A predominância das ligações α -(1,6) é característica comum das dextranas (ASPINALL, 1982). Para uso clínico, a dextrana deve ser composta de no mínimo 95% de ligações α -(1,6)-glicopiranosídicas e no máximo 5% de ligações α -(1,3). A dextrana também contém quantidades variáveis de ligações glicosídicas α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4), que correspondem às ramificações da cadeia principal (ROBYT, 1995).

A dextrana é um polímero natural hidrofílico, solúvel em água, inerte aos sistemas biológicos e não afeta a viabilidade celular. A dextrana e seus derivados têm propriedades reológicas excelentes, e têm sido imensamente empregados como veículo de agentes terapêuticos incluindo antibióticos, anti-diabéticos, drogas anticâncer, peptídeos e enzimas (MOLTENI, 1979; POZNANSKY; CLELAND, 1980).

3.1.2 Purificação da dextranasacarase

A dextranasacarase forma agregados com seus produtos polissacarídeos tomando formas moleculares múltiplas, o que torna sua purificação mais difícil (KOBAYASHI; MATSUDA, 1976; ROBYT; WALSETH, 1979; MILLER; EKLUND; ROBYT, 1986; FU; ROBYT, 1990).

O gel Sephadex tem sido utilizado como adsorvente para a purificação da enzima dextranasacarase (KOBAYASHI; MATSUDA, 1976; HAMELIK; MCCABE, 1982; MILLER et al., 1986; KOBBS et al., 1990). A eluição da enzima do Sephadex

tem sido conseguida com soluções de ureia, guanidina HCl (MILLER; EKLUND; ROBYT, 1986) ou dodecil sulfato de sódio (KOBBS et al., 1990), apesar de ser necessária exaustiva diálise para remoção destes compostos químicos. A própria dextrana também já foi empregada como agente eluente (KOBAYASHI; MATSUDA, 1976; MILLER et al., 1986), sendo removida posteriormente com tratamento com dextranase, que é removida na sequência por cromatografia. Embora alguns estudos tenham reportado que a conformação nativa da dextranasacarase pode ser afetada em presença da dextranase (MILLER et al., 1986, WILLEMOT; MONSAN; DURAND, 1988; FU; ROBYT, 1990). Robyt, Walseth, (1979) e Miller et al., (1986) reportaram a purificação de dextranasacarase usando dextranase para remover a dextrana conjugada à enzima e aumentaram a quantidade de enzima purificada de miligrama para grama, apesar de ser um procedimento trabalhoso que requer várias etapas de hidrólise.

Um grande problema nos processos comumente utilizados para a purificação da dextranasacarase tem sido que os rendimentos são baixos ou falham na remoção de impurezas importantes, especialmente polissacarídeos (KOBAYASHI; MATSUDA, 1976; ROBYT; WALSETH, 1979; MILLER et al., 1986; KIM; KIM, 1999). Kim, Robyt, (1994a) e (1994b) conseguiram contornar este problema construindo uma linhagem mutante a partir da B 512FM, chamada de *Leuconostoc mesenteroides* B 512 FMC, que apresenta grande facilidade de purificação da dextranasacarase, com acréscimo da atividade.

3.1.3 Purificação da dextranasacarase por precipitação com polietileno glicol

Russel, (1979) purificou dextranasacarase de *Streptococcus mutans* por precipitação com PEG 400 e 6000 e reportou que o PEG 6000 precipitava outras proteínas diferentes da dextranasacarase, enquanto o PEG 400 era mais específico na precipitação. Diferentes massas molares têm sido empregadas na precipitação de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F (GOYAL; KATIYAR, 1994). O PEG 400 mostrou atividade específica de 8,7 e rendimento de 80%. Nigam, Goyal, Katiyar, 2006 ao estudarem a purificação de dextranasacarase de *Leuconostoc*

mesenteroides NRRL B 512 F com PEG, concluíram que o PEG 6000 apresenta melhores resultados que PEG 400. Purama, Goyal, 2008 reportou um eficiente método de purificação de dextranasacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 usando PEG seguido de cromatografia de filtração em gel. Em 2009, os mesmos autores (PURAMA; GOYAL, 2009) usaram PEG 400 25% v/v para purificação da mesma enzima com uma incrível redução das etapas do procedimento.

3.1.4 Cromatografia de filtração em gel

A cromatografia de filtração em gel separa as moléculas de acordo com suas diferenças de tamanho, pela passagem através do gel de filtração empacotado dentro de uma coluna. Ao contrário da cromatografia de afinidade ou de troca iônica, as moléculas não se ligam ao meio cromatográfico, portanto o tampão de eluição não afeta diretamente no grau de separação entre os picos. Consequentemente, uma vantagem significativa da cromatografia de filtração em gel é que as condições podem ser variadas para se ajustarem ao tipo de amostra ou ao tipo de purificação subsequente, análise ou estocagem e alterar a separação.

A filtração em gel se adapta bem a biomoléculas que são sensíveis a variações de pH, este é o caso da enzima dextranasacarase, que perde significativamente a atividade com variações no pH à concentração de íons metálicos ou co-fatores e à condições drásticas ambientais. A separação pode ser conduzida na presença de íons essenciais ou cofatores (no caso da dextranasacarase, é essencial utilizar 20 mM de CaCl_2 no tampão eluente), detergentes, ureia, guanidina, em altas ou baixas concentrações iônicas, à 37°C ou sob refrigeração. No caso da dextranasacarase é imprescindível realizar todo o procedimento à 4°C para minimizar as perdas de atividade enzimática, de acordo com as condições exigidas pelo experimento, contudo uma coluna bem empacotada é o ponto crítico para se obter uma boa resolução em cromatografia de filtração em gel (BIOSCIENCES, [S.d.]).

A seleção do meio cromatográfico ideal para a separação por filtração em gel depende do tipo de porosidade da matriz e de sua estabilidade física e

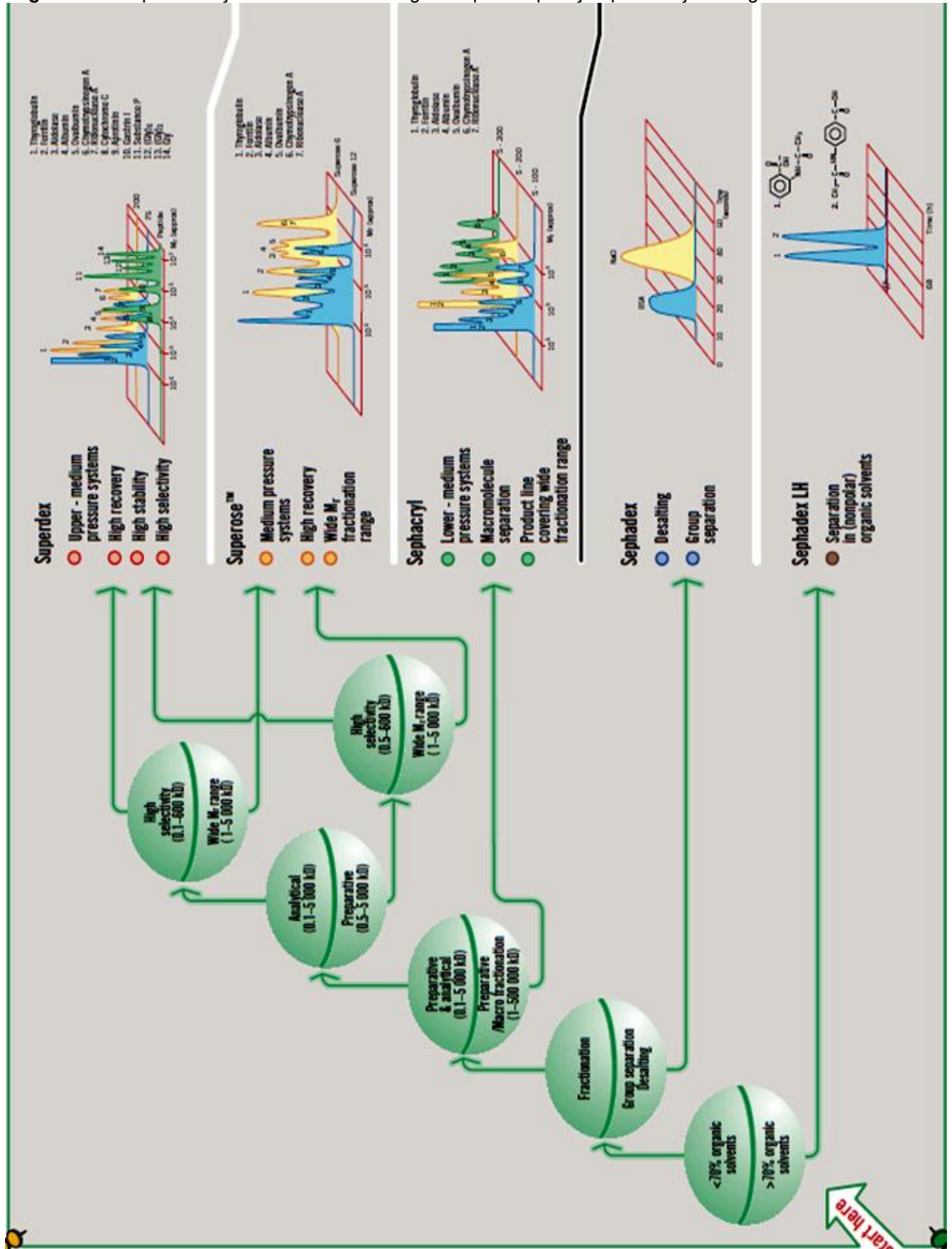
química. O tamanho de cada partícula e de seus poros define a seletividade do meio e podem cobrir uma faixa de separação de peptídeos a proteínas bastante grandes em tamanho, 100 a 80 000 000 Da.

Para escolher um meio apropriado para a separação cromatográfica, é necessário considerar os dois pontos a seguir:

- O objetivo do experimento, alta resolução das frações ou separação de grupos);
- A massa molar das proteínas de interesse e dos contaminantes que devem ser separados.

A Figura 1, retirada do manual da Biosciences, (n.d.) apresenta o guia passo a passo para a escolha do meio.

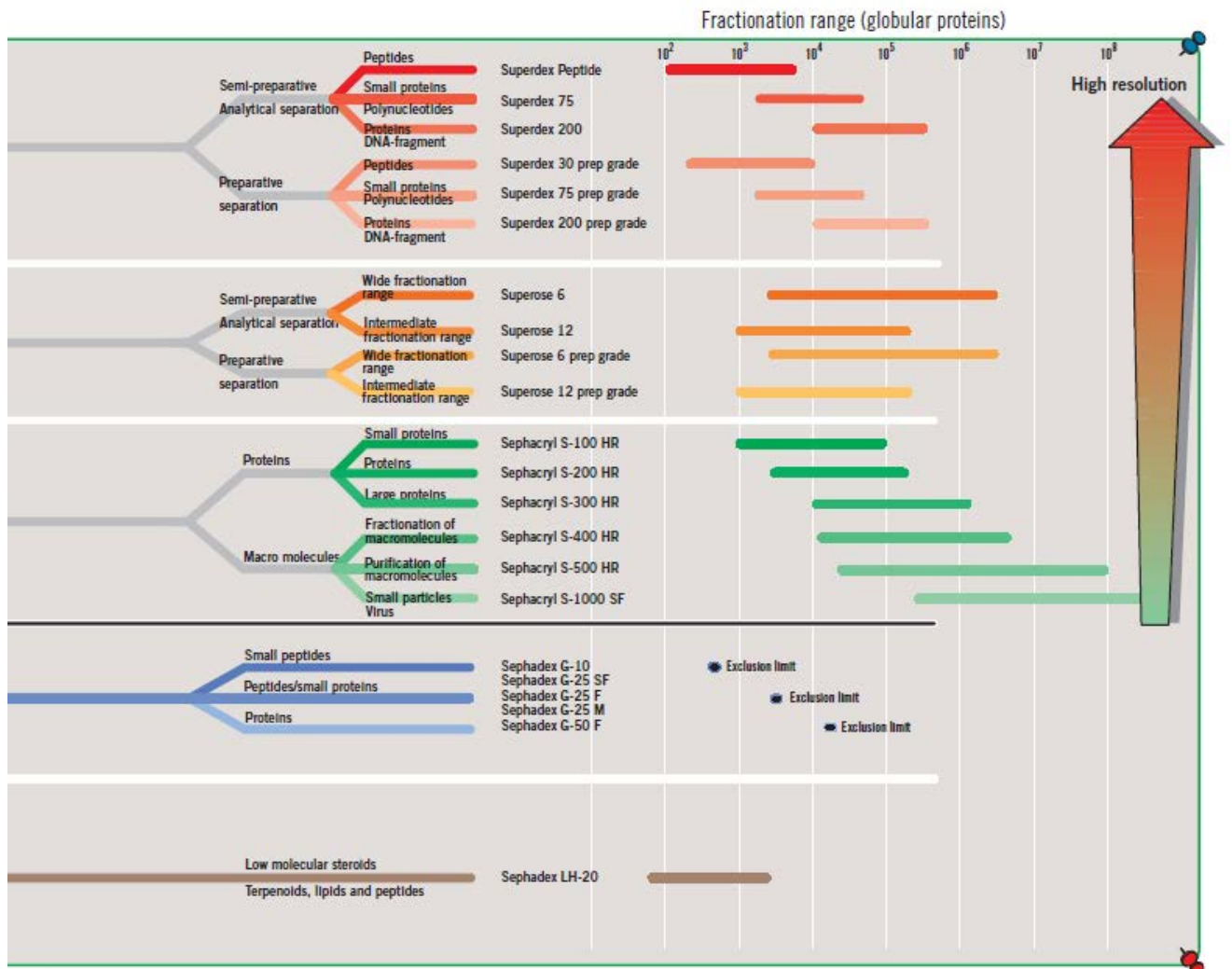
Figura 1. Guia para seleção da resina cromatográfica para separação por filtração em gel



Fonte: Biosciences, [s.d.].

Após a decisão de qual meio cromatográfico a ser utilizado, o próximo passo foi a seleção da faixa que cobre a massa molar da molécula de interesse (Figura 2).

Figura 2. Faixa de separação para meios cromatográficos de separação por filtração em gel.

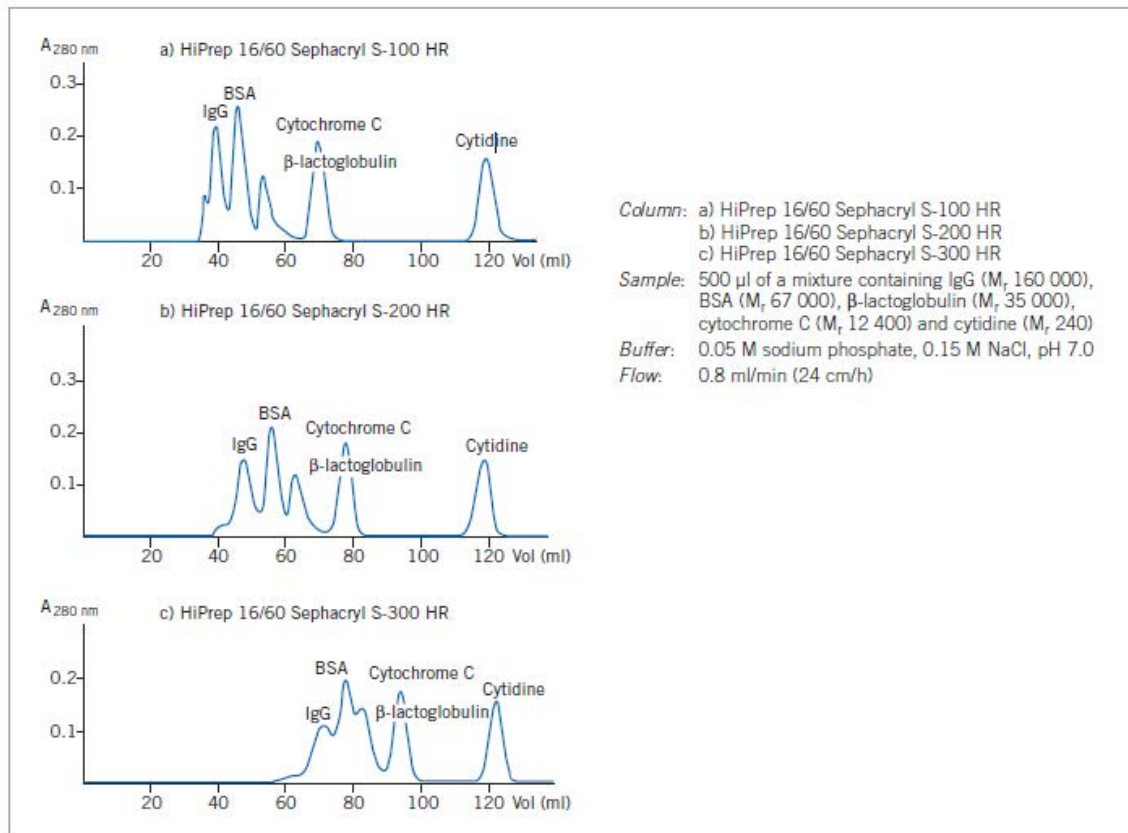


Fonte: Biosciences, [s.d.].

Para a separação da dextranasacarase (160 kDa), a resina escolhida foi Sephacryl S-200 HR.

A Figura 3 mostra uma comparação entre diferentes seletividades da resina Sephacryl HR. Observa-se que a resina Sephacryl S-200 HR apresentou melhor resolução do pico referente à separação da IgG, que apresenta massa molar próxima da dextranasacarase (160 kDa).

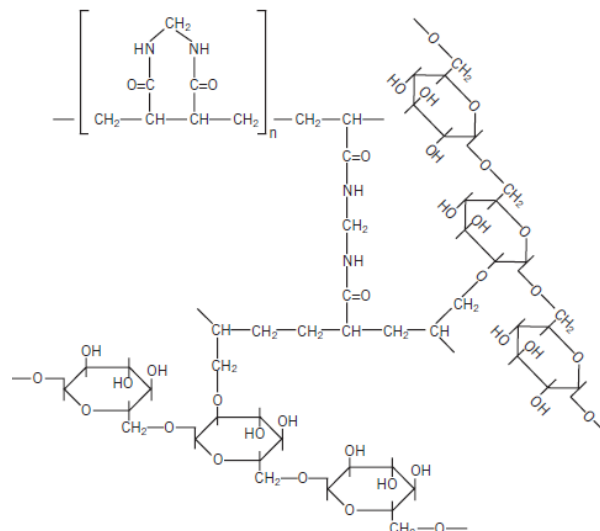
Figura 3. Comparação de seletividade para colunas HiPrep 16/60 de Sephacryl S-100 HR, S-200 HR e S-300 HR.



Fonte: Biosciences, [s.d.].

A resina Sephacryl High Resolution (HR) é formado por ligações covalentes cruzadas de alil dextrana com N,N'-metileno bisacrilamida, formando uma matriz hidrofílica com alta resistência mecânica (Figura 4).

Figura 4. Estrutura parcial do Sephacryl High Resolution.



Fonte: Biosciences, [s.d.].

A resina cromatográfica Sephacryl High Resolution (HR) é um gel de filtração para cromatografia altamente versátil, que oferece uma ampla faixa de capacidade de separação, além de ser bastante adequado para uso em indústrias por apresentar estabilidade química e tolerância a fluxos altos (BIOSCIENCES, N.D.; BIOSCIENCES, 1998). A matriz rígida e hidrofílica da Sephacryl minimiza a adsorção não específica enquanto maximiza a recuperação (BIOSCIENCES, 1998).

Na SDS-PAGE, a mistura de proteínas é desnaturada pelo calor 100°C em presença de excesso de SDS e de um reagente tiol, o qual é empregado para quebrar as pontes de sulfeto. Sob estas condições, todos os polipeptídios reduzidos se ligam à mesma quantidade de SDS em uma massa base (1,4 g SDS/g polipeptídeo) independentemente da composição de aminoácidos e da sequência da proteína. O complexo SDS / proteína forma uma banda que caminha uma distância proporcional à massa da proteína. Todas as proteínas ficam carregadas negativamente com cargas de densidade similares e por isso podem ser separadas de acordo com suas massas (SHI; JACKOWSKI, 1998).

3.1.5 Estimativa da massa molar da proteína

O SDS se liga principalmente às regiões hidrofóbicas dos polipeptídios, portanto as regiões hidrofílicas ligam bem menos SDS (CRAIG; TOLLEY; BORROW, 1976). Da mesma forma polipeptídios não redutores, contendo ligações de sulfeto intactas, ligam bem menos SDS que proteínas redutoras. O aumento da força iônica diminui a quantidade de ligações com SDS (CRAIG, 1973).

Para uma determinação precisa da massa molar por SDS-PAGE, todos os polipeptídios (padrões e desconhecidos) devem se ligar a uma quantidade ótima de SDS e assumir a mesma conformação e forma. Claramente, as proteínas padrão e as desconhecidas devem ser separadas eletroforeticamente sob as mesmas condições e ao mesmo tempo (de preferência no mesmo gel). Sob estas condições ideais, a massa molar dos polipeptídios desconhecidos pode ser estimada de acordo com suas mobilidades relativas (COHEN, 1973).

3.2 Material e métodos

3.2.1 Organismo

A bactéria utilizada para a produção da enzima foi *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, isolada de uma usina de açúcar e álcool da Divisão de Controle Microbiológico de Processo Industrial da Fermentec (Brasil), identificada e depositada no GenBank, com o número de acesso da sequência nucleotídica nuc_1.sqn nuc_1 JF812153. A bactéria foi estocada à -20°C em 10% de glicerol até a preparação do inóculo (5% v/v) para a fermentação.

3.2.2 Produção da enzima

A dextranasacarase FT045B foi obtida a partir da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* FT045B cultivada em meio composto por melaço de cana de açúcar (40 g/L), água de maceração de milho (20 g/L), K₂HPO₄ (27 g/L), CaCl₂ (0,02 g/L), MgSO₄ (0,2 g/L), NaCl (0,01 g/L), FeSO₄ (0,01 g/L) e MnSO₄ (0,01 g/L), conforme otimização da produção determinada em trabalho de mestrado da aluna (VETTORI et al., 2012). Para o inóculo foi preparado um pré inóculo da bactéria por 18 horas à 25°C (v/v) ao meio fermentativo.

A fermentação se deu à 25°C por 18 horas, decorrido esse tempo, o matéria fermentado foi centrifugado por 30 minutos e a atividade determinada pelo método gravimétrico, no qual 1,0 IU = 1,0 µmol de D-glicose incorporada na dextrana por minuto.

3.2.3 Análise da atividade enzimática

A atividade da dextranasacarase deveria ser analisada pelo novo método gravimétrico desenvolvido pela aluna, Mary Helen Palmuti Braga Vettori, durante seu mestrado, com auxílio e orientação do pesquisador Rupendra Murkejea e do professor Dr. John Robyt, quando em estágio realizado no Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Enzymology, Department of Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology, Iowa State University, Ames, IA, USA. (VETTORI;

MUKERJEA; ROBYT, 2011), contudo a presença de polietilenoglicol em algumas etapas impossibilitou a aplicação desta nova metodologia devido à formação de aglomerado bastante insolúvel de PEG-dextranasacarase-dextrana. Foi utilizado um método semelhante, porém com algumas modificações/adaptações. As etapas de lavagem seguidas de precipitação foram excluídas, sendo que um volume único, no entanto 100 vezes maior de amostragem, foi retirado do meio reacional para a quantificação da dextrana produzida.

Para tanto, a reação enzimática foi preparada pela adição de 2,5mL de solução (piridina/ácido acético 20mM, pH 5,2) em 2,5mL de sacarose 400mM, e pré-aquecido à 30°C por 5 minutos. A reação enzimática iniciou com a adição de 5mL de dextranasacarase e foi incubada à 30°C. Após 20 minutos a solução foi precipitada em 20mL de etanol absoluto, gelado.

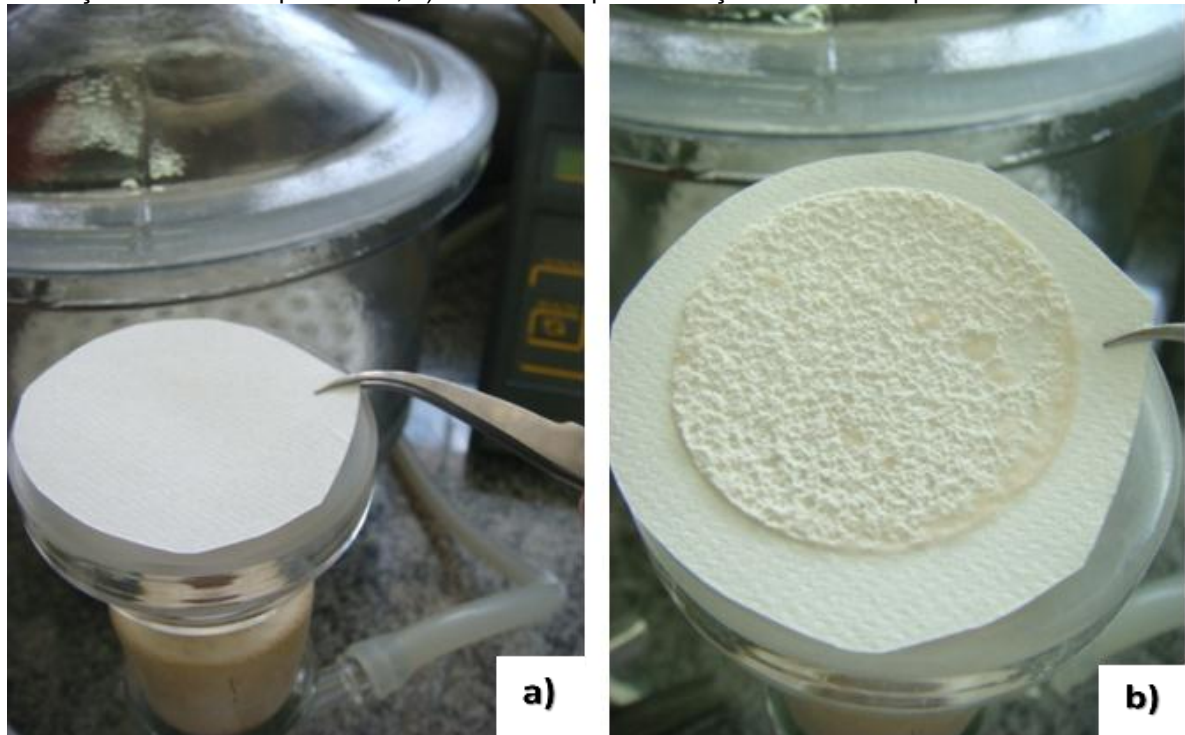
Membranas filtrantes com porosidade de 3 micron foram colocadas em uma estufa à 60°C por 15 minutos, em seguida foram levadas ao dessecador até atingirem temperatura ambiente. Após resfriamento, as membranas foram pesadas em balança analítica.

As membranas foram posicionadas em sistema de filtração a vácuo (Figura 5) e umedecidas com 1mL de etanol absoluto, gelado, em seguida a amostra, anteriormente precipitada em etanol, foi vertida e filtrada. A dextrana produzida permaneceu retida na membrana (Figura 5).

Após filtração a vácuo, as membranas foram levadas à estufa novamente, onde permaneceram por 20 minutos, foram resfriadas no dessecador por 15 minutos e em seguida suas massas foram verificadas, até massa constante.

A massa da dextrana produzida foi obtida pela diferença entre a massa final e a massa inicial da membrana antes da filtração. A partir da massa, foi verificado quantos gramas de dextrana, 1mL de enzima é capaz de produzir. Em seguida, a massa encontrada foi transformada em micro mols de glicose, e sabendo quanto a enzima produziu em 20 minutos, foi estimado quanto a enzima produziria em 1 minuto.

Figura 5. Determinação da atividade enzimática da dextranasacarase FT 045B. a) membrana antes da filtração da dextrana produzida; b) membrana após a filtração da dextrana produzida.



Fonte: Dados do próprio autor.

3.2.4 Quantificação Protéica

A quantificação de proteínas do extrato livre pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), que é comumente utilizado na determinação da concentração de proteínas, inclusive de dextranasacarase (KITAOKA; ROBYT, 1998).

Foram adicionados 50 μ L de amostra em 750 μ L de água destilada. Em seguida, 200 μ L do reagente Bradford. Após 15 minutos, foi efetuada a leitura no espectrofotômetro em uma absorbância de 595nm. A curva padrão foi tratada da mesma maneira que as amostras, utilizando albumina de soro bovino como referência.

3.2.5 Purificação da dextranase por fracionamento com PEG

Polietileno glicóis de diferentes massas molares (PEG-1500, PEG-4000) deveriam ser adicionados à 200 mL do caldo fermentado, livre de células, na quantidade ideal para se obter as concentrações finais de 30, 40, 50 e 60 (% v/v), entretanto, estas concentrações de polietileno glicóis, por serem bastante elevadas,

tornaram o meio saturado, impossibilitando a completa dissolução do agente precipitante (PEG). Após alguns testes, concentrações possíveis de serem dissolvidas no caldo fermentado (livre de células) foram combinadas em forma de matriz de planejamento fatorial completo.

Foi realizado um planejamento fatorial completo 3^2 com doze experimentos, contendo três repetições do ponto central, as variáveis empregadas foram às concentrações de PEG 1500 e 4000 e o resultado avaliado foi a diferença entre a atividade específica ao final de cada precipitação e a atividade específica do caldo bruto.

Tabela 1. Matriz de planejamento experimental Fatorial Completo 3^2 codificada com duas variáveis.

Experimento	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	X_1	X_2	PEG 1500 (%) m/v	PEG 4000 (%) m/v
1	-1	-1	10	10
2	-1	0	10	20
3	-1	1	10	30
4	0	-1	20	10
5	0	0	20	20
6	0	0	20	20
7	0	0	20	20
8	0	0	20	20
9	0	1	20	30
10	1	-1	30	10
11	1	0	30	20
12	1	1	30	30

X_1 – PEG 1500 (%) m/v

X_2 – PEG 4000 (%) m/v

Fonte: Dados do próprio autor.

A enzima foi produzida, conforme procedimento descrito no item 3.2.2, por fermentação de 18h de duração. O meio de cultura foi centrifugado a 10.000g por 30 minutos à 4°C, obtendo o caldo bruto, que foi analisado quanto à atividade específica.

Polietileno glicóis de diferentes massas molares (PEG-1500, PEG-4000), previamente congelados foram adicionados aos poucos, sob lenta agitação, a 180 mL do caldo fermentado livre de células, na quantidade ideal para se obter as concentrações finais de 10, 20 e 30% (m/v). O polietilenoglicol adicionado continuou sendo agitado lentamente, a 4°C, até completa dissolução das escamas e

imediatamente após, a mistura foi centrifugada a 13.000g por 20 minutos à 4°C para separar a enzima precipitada. As soluções deveriam permanecer em repouso por 12h à 4°C para permitir a precipitação da enzima antes da centrifugação, contudo observou-se que existe uma perda de rendimento de 50% na precipitação da enzima, tratando-a desta forma. O precipitado foi ressuspensão em volume definido de tampão piridina/ácido acético 20 mM pH 5.2 e analisado quanto ao teor proteico e quanto à atividade enzimática da dextranasacarase.

Logo após ressuspender as amostras em tampão, estas foram extensivamente dialisadas em tampão piridina/ácido acético 20 mM (pH 5.2), utilizando uma membrana 5kDa “*cutoff*” e após cada diálise, o volume das amostras foi mensurado para que as diferentes quantidades de PEG fossem pesadas e congeladas para posterior precipitação, mantendo as concentrações finais de 10, 20 e 30% (m/v). Após cada etapa de precipitação as amostras foram submetidas à centrifugação (20 minutos a 4°C e 13.000g) e assim por diante até completar 4 repetições.

3.2.6 Diálise

Para realização da diálise foram utilizadas membranas de 5 KDa previamente tratadas. As membranas foram imersas em uma solução contendo bicarbonato de Sódio 10g/L e 1 mM de EDTA em água destilada. As membranas foram fervidas por 30 minutos e, em seguida, lavadas abundantemente em água destilada.

Após as precipitações com PEG, as amostras foram colocadas no interior das membranas e imersas em tampão (Piridina/Ácido acético 20 mM, pH 5,2) gelado, sendo o volume de tampão 50 vezes maior que o das amostras. Os frascos utilizados na diálise foram levados à câmara fria (8°C) e deixados sob agitadores para tornar a diálise mais eficiente. A diálise durou em média 48h.

Ao término de cada diálise os volumes das amostras foram mensurados para proceder à precipitação com PEG. Além disso, foram retiradas alíquotas para análise de eletroforese.

3.2.7 Análise da enzima purificada por SDS-PAGE

A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foi preparada utilizando um sistema vertical (GE) com gel de 1,5 mm, seguindo o método de Laemmli, 1970. A análise de SDS-PAGE foi preparada com gel de resolução 7,5% acrilamida/bis-acrilamida e gel de empacotamento de 3,5% (m/v) de acrilamida/bis-acrilamida. As amostras de proteína foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,0625M pH 6,8 contendo 2,3% (m/v) de dodecil sulfato de sódio, 10% (m/v) de glicerol, 5% (m/v) de 2-mercaptoetanol e 0,05% (m/v) de azul de bromofenol. Todas as amostras migraram no gel sob condições desnaturantes, sob corrente elétrica de 70 a 100 mA. As bandas proteicas foram fixadas em solução de ácido acético 5% (v/v) por 5 min, coradas em solução de Coomassie brilliant blue 0,25% (m/v) e descoradas por repetidas vezes em solução contendo metanol 20% e ácido acético 10% (v/v). Foi usado marcador molecular adquirido da Sigma, Chemical Company: Miosina de músculo de coelho (205.000), β -Galactosidase, *Escherichia coli* (116.000), Fosforilase G de músculo de coelho (97.400), Albumina de Plasma bovino (66.000), Albumina de ovo (45.000), Anidrase carbônica de eritrócitos bovinos (29.000).

3.2.8 Determinação da massa molar da dextranasacarase utilizando gel de concentração uniforme

A massa molar da dextranasacarase foi estimada pelo procedimento a seguir, adaptado da referencia (BROWN; YET; WOLD, 1982). A determinação da massa molar por esta técnica tem precisão de $\pm 10\%$.

- o gel, após a corrida, foi fotografado. As distâncias percorridas pela banda de azul de bromofenol e por cada polipeptídio (padrão ou desconhecido) a partir do topo do gel de resolução foram medidas.

- O R_f (mobilidade relativa) para cada polipeptídio foi calculado pela equação:

$$R_f = \text{distância percorrida pela proteína} / \text{distância percorrida pelo corante}$$

- O gráfico R_f versus M_r (massa molar) dos padrões foi plotado em *Microsoft Excel* (*Microsoft Officer 2007*).

- O valor de R_f da banda referente à dextranasacarase foi interpolado no gráfico dos padrões para estimativa de sua massa molar.

3.2.9 Identificação da dextranasacarase por atividade das bandas resultantes

Para se determinar a atividade *in situ* da dextranasacarase em gel de acrilamida 7,5%, o experimento que apresentou melhor rendimento durante as precipitações com polietilenoglicol foi separado e sob condições não desnaturantes em SDS usando um protocolo descrito por Holt, Al-Sheikh, Shin, (2001), com algumas modificações fez-se a determinação. Após a corrida, o gel ficou em solução tampão piridina/acetato (20 mM, pH 5,2, 0,3 mmol L⁻¹ CaCl₂ e 0,1% Tween 80) à 4°C por 30 minutos. Posteriormente o gel foi incubado em tampão piridina/acetato (20 mM, pH 5,2, 0,3 mmol L⁻¹ CaCl₂) suplementado com 5% de sacarose por 48h à 30°C. Após a incubação, o gel foi lavado uma vez com solução de metanol: ácido acético (50:10), em água por 30 minutos, depois em água por mais 30 minutos, e então incubado em solução de ácido periódico (1% ácido periódico e 3% ácido acético) por 45 minutos à temperatura ambiente.

Após o tratamento em ácido periódico, o gel foi lavado em água por 2 h em várias trocas. O gel, então ficou em repouso em reagente de Schiff (0,5% w/v Fucsina básica, 1% bissulfito de sódio e 0,1N HCl) até o aparecimento de cor magenta em cada banda do gel, confirmando a atividade da dextranasacarase. O outro gel foi incubado em solução de rafinose 5%, um substrato específico para frutossiltransferases (inulansucrase e levansucrase), para confirmar a presença da dextranasacarase e excluir a presença de frutossiltransferases.

3.2.10 Purificação da dextranasacarase por cromatografia em filtração em gel

O experimento de purificação de dextranasacarase, que apresentou o melhor resultado na primeira etapa de purificação com PEG, foi dialisado extensivamente em tampão piridina/acetato 20 mM, pH 5,20, liofilizado e aplicado

em uma coluna de vidro, contendo sephacryl S-200HR com 40 mL de volume equilibrado com tampão piridina/acetato 20 mM pH 5,2. A enzima foi eluída a um fluxo de 0,2 mL/min e as amostras de 2 mL coletadas, foram analisadas em espectrofotômetro (280nm) para detectar a presença de proteínas. As frações que apresentaram maiores absorbâncias foram agrupadas e analisadas quanto à atividade específica. As amostras que apresentaram melhores resultados foram liofilizadas e analisadas por SDS-PAGE.

3.3 Resultados e discussões

3.3.1 Purificação da dextranasacarase com PEG 1500 e PEG 4000

Vários métodos como ultra-filtração, precipitação com sais ou PEG, cromatografia ou separação de fase e combinações entre estes métodos já foram empregados visando purificação da dextranasacarase (MAJUMDER; KIRAN; PURAMA, 2007). A primeira tentativa de purificação da dextranasacarase foi pela precipitação com sulfato de amônio e daí por diante, uma imensa variedade de técnicas foram empregadas com o mesmo propósito (ROBYT; WALSETH, 1979; KABOLI; REILLY, 1980; KOBAYASHI; MATSUDA, 1980; MONSAN; LOPEZ, 1981; PAUL et al, 1984; MILLER et al., 1986; FU; ROBYT, 1990; RHEE; LEE, 1991; GOYAL; KATIYAR, 1994; NIGAM et al., 2006).

Em suma, é possível dizer que o uso do sulfato de amônio como agente precipitante é completamente ineficiente, fazendo com que ocorra perda de atividade enzimática (ROBYT; WALSETH, 1979b).

Neste estudo optou-se por precipitar a dextranasacarase com PEG, já que consiste em um procedimento simples e efetivo, uma vez que este é um polímero hidrofílico e não iônico, e é conhecido por ser eficiente na precipitação seletiva de proteínas com alta massa molar média ou em forma de agregados, uma vez que a dextranasacarase forma agregados com a própria dextrana produzida, apresenta a vantagem de ser facilmente extraído por diálise, além do fato de que a formação e o equilíbrio do precipitado formado é mais rápido com PEG que com sulfato de amônio ou etanol (DEUTSCHER, 1990; ASENJO, 1990). Russel, (1979) e Goyal, Katiyar, (1994) também mostraram preferência na purificação com PEG.

Há estudos com PEG de massas molares maiores, por exemplo PEG 20.000. Este procedimento de precipitação é relativamente fácil de obter a dextranasacarase purificada, livre de contaminação com outras enzimas, contudo existe uma precipitação concomitante do carboidrato formado, neste caso, a dextrana. A dextrana é um contaminante comum neste tipo de purificação, mas ela pode ser facilmente removida após diálise (RUSSEL, 1979; SU; ROBYT, 1994).

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos em todas as etapas de precipitação da enzima com PEG.

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos com a purificação da enzima dextranasacarase FT045B por precipitação com PEG, usado Planejamento Fatorial Completo 3².

Exp.	Etapa	Volume (mL)	Atividade Enzimática (U)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
1	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	50,0	193,5	252,7	0,8	19,7	2,4
	2ª precipitação	7,0	50,1	34,4	1,5	5,1	4,6
	3ª precipitação	4,0	14,3	3,1	4,6	1,5	14,6
	4ª precipitação	3,0	2,2	2,2	1,0	0,2	3,2
2	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	58,0	296,1	350,9	0,8	30,1	2,7
	2ª precipitação	9,5	73,2	56,5	1,3	7,4	4,1
	3ª precipitação	7,0	28,0	14,0	2,0	2,8	6,4
	4ª precipitação	7,0	3,5	13,2	0,3	0,4	0,8
3	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	70,0	232,9	336,3	0,7	23,7	2,2
	2ª precipitação	14,0	28,1	68,3	0,4	2,9	1,3
	3ª precipitação	17,0	60,3	47,8	1,3	6,1	4,0
	4ª precipitação	5,0	9,1	12,1	0,8	0,9	2,4
4	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	75,0	173,6	339,0	0,5	17,6	1,6
	2ª precipitação	14,0	81,9	82,7	1,0	8,3	3,2
	3ª precipitação	9,0	41,3	39,1	1,1	4,2	3,4
	4ª precipitação	6,0	11,5	21,6	0,5	1,2	1,7
5	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	97,0	190,4	473,0	0,4	19,3	1,3
	2ª precipitação	14,0	51,4	69,8	0,7	5,2	2,4
	3ª precipitação	12,0	33,7	41,4	0,8	3,4	2,6
	4ª precipitação	6,0	16,2	18,8	0,9	1,6	2,7
6	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	122,0	222,9	521,1	0,4	22,6	1,4
	2ª precipitação	35,0	94,5	144,5	0,7	9,6	2,1
	3ª precipitação	12,0	54,6	47,0	1,2	5,5	3,7
	4ª precipitação	4,0	1,5	7,0	0,2	0,2	0,7
7	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	112,0	110,6	422,6	0,3	11,2	0,8
	2ª precipitação	30,0	43,5	132,4	0,3	4,4	1,0
	3ª precipitação	11,0	21,4	27,4	0,8	2,2	2,5
	4ª precipitação	6,0	3,6	14,7	0,2	0,4	0,8
8	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	130,0	119,6	518,2	0,2	12,1	0,7
	2ª precipitação	43,0	0,0	6,2	0,0	0,0	0,0
	3ª precipitação	14,0	26,6	43,4	0,6	2,7	2,0
	4ª precipitação	7,0	3,1	21,4	0,1	0,3	0,5

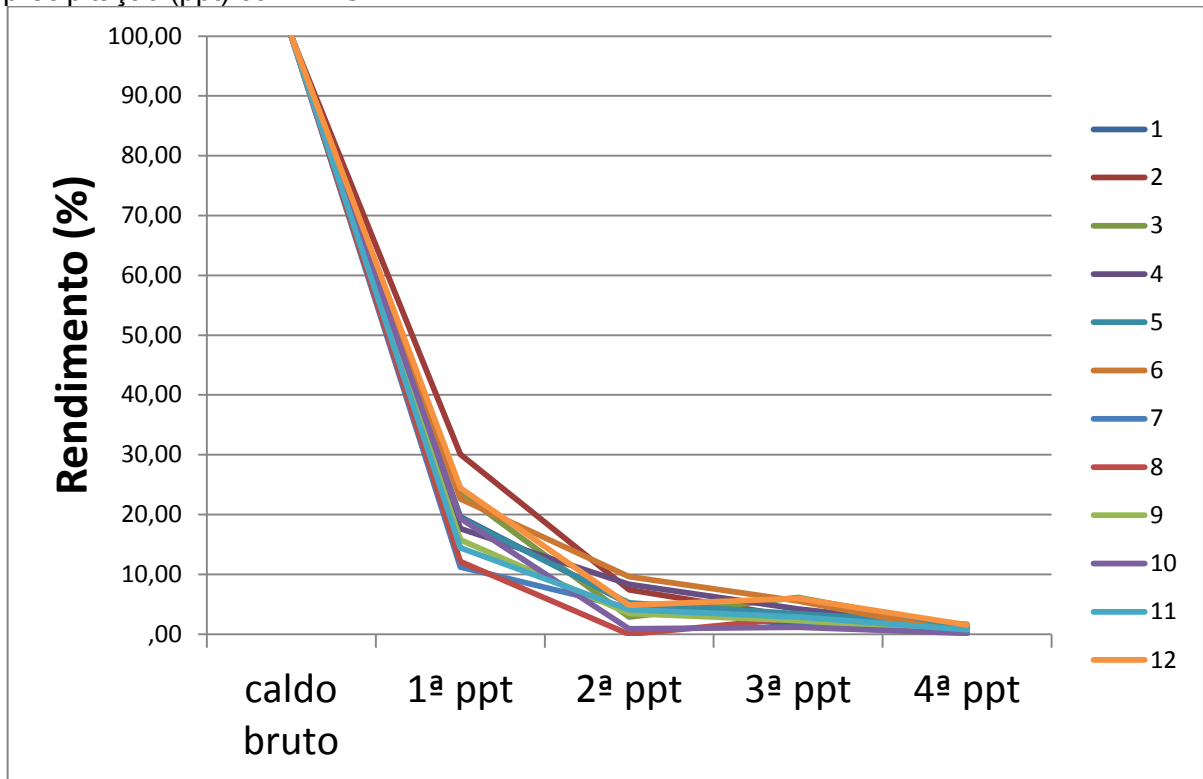
Continuação da Tabela 2							
9	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	82,0	155,4	583,7	0,3	15,8	0,8
	2ª precipitação	43,0	33,8	231,1	0,1	3,4	0,5
	3ª precipitação	17,5	22,4	46,1	0,5	2,3	1,6
	4ª precipitação	7,0	3,4	15,7	0,2	0,3	0,7
10	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	64,0	190,4	400,9	0,5	19,3	1,5
	2ª precipitação	7,0	9,0	15,7	0,6	0,9	1,8
	3ª precipitação	5,0	11,4	3,0	3,8	1,2	12,0
	4ª precipitação	7,0	1,3	7,5	0,2	0,1	0,6
11	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	73,0	142,4	509,2	0,3	14,5	0,9
	2ª precipitação	24,0	40,4	123,9	0,3	4,1	1,0
	3ª precipitação	10,0	28,1	34,5	0,8	2,9	2,6
	4ª precipitação	5,0	7,2	16,7	0,4	0,7	1,4
12	caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
	1ª precipitação	97,0	240,7	659,4	0,4	24,4	1,2
	2ª precipitação	29,0	47,9	127,0	0,4	4,9	1,2
	3ª precipitação	12,0	59,1	79,0	0,7	6,0	2,4
	4ª precipitação	7,0	14,9	38,6	0,4	1,5	1,2

Fonte: Dados do próprio autor.

Para facilitar a visualização, os dados referentes à atividade específica foram dispostos no Figura 6, onde pode-se constatar que houve decréscimo da atividade específica após a primeira precipitação, em todos os experimentos, exceto no experimento 5, onde a atividade específica aumentou após cada precipitação.

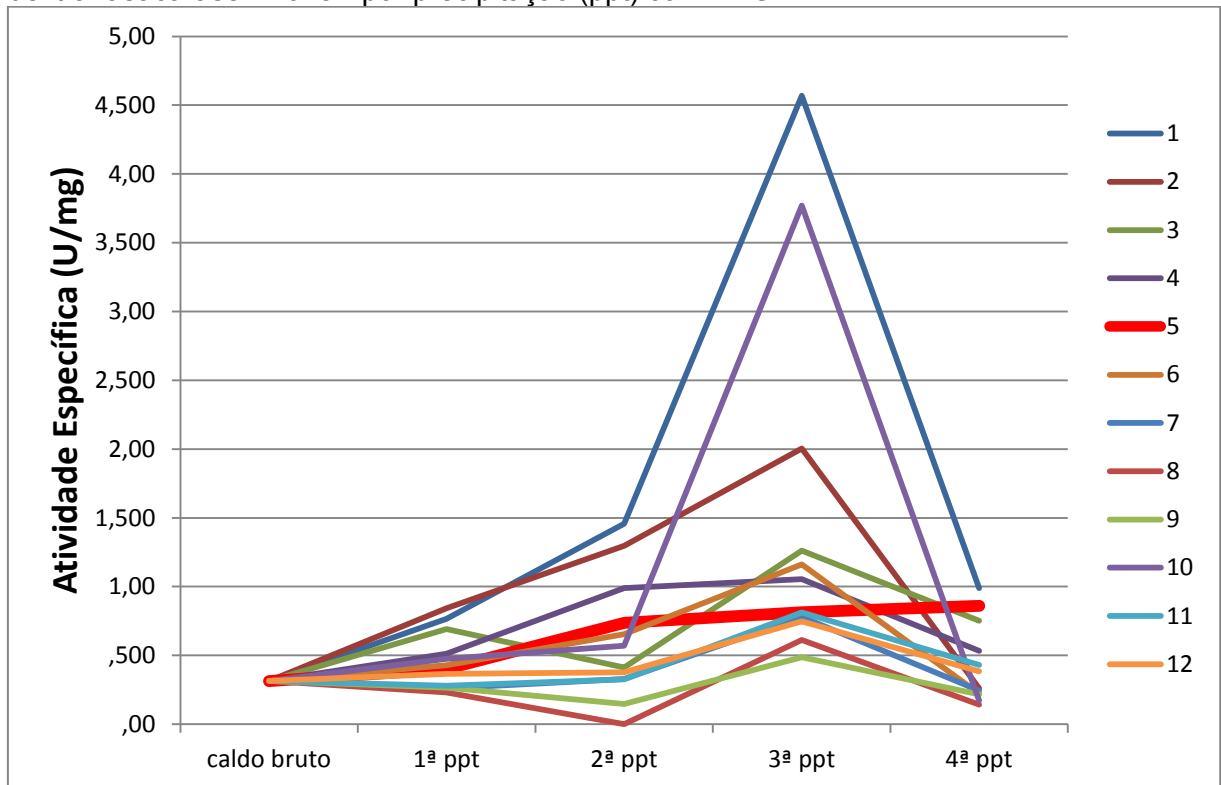
O Figura 7 mostra o comportamento dos experimentos em termos de rendimento. É possível observar que há um decréscimo do rendimento (%) da enzima após cada precipitação. Isto pode ser explicado pelo fato de que ao passo que são efetuadas as precipitações subsequentes, a quantidade de dextrana presente no caldo diminui, justificando a ineficiência da precipitação com PEG, uma vez que o aglomerado formado (enzima – PEG) é mais estável na presença de dextrana. Uma possível solução seria a adição de dextrana antes das precipitações, contudo testes relativos à quantidade deveriam ser realizados previamente, tornando este procedimento inviável neste momento. Goyal, Katiyar, (1994), também observaram o mesmo comportamento de decréscimo na atividade enzimática da enzima, após consecutivas precipitações com diferentes concentrações de PEG 400.

Figura 6: Rendimento (%) das etapas de purificação da enzima dextranasarase FT045B por precipitação (ppt) com PEG.



Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 7: Atividade específica de todas as etapas de purificação da enzima dextranasacarase FT045B por precipitação (ppt) com PEG.



Fonte: Dados do próprio autor.

A análise estatística dos dados foi feita por análise da ANOVA (Tabela 3) da diferença de atividade específica entre cada etapa de purificação e o caldo bruto, utilizando o programa *Statistica 7.1*. A determinação dos parâmetros significativos foi feita pelo teste de hipótese *t-student* com nível de significância de 5%. O coeficiente de correlação ao quadrado R^2 corrigido (ajustado) também foi utilizado para todas as respostas, a fim de constatar a significância ou não do modelo ajustado.

Na primeira e segunda precipitação, o PEG 1500 isoladamente demonstrou ser significativo na purificação da dextranasacarase. Na terceira e quarta precipitação, nenhuma das variáveis estudadas foram significativas.

Na ANOVA da primeira precipitação é possível observar que o coeficiente linear da equação (PEG 1500) demonstrou ser significativo para o modelo, uma vez que o t está bastante distante de zero, a probabilidade de erro é extremamente reduzida e, com 5% de nível de significância, o intervalo de confiança não passa por zero. Purama, Goyal, (2008), também testaram a precipitação da dextranasacarase com PEG-1500 e obtiveram alta atividade específica em comparação com outros PEG's de massas molares menores.

Para a variável linear PEG 4000 e para as quadráticas PEG 1500 e 4000, embora o erro padrão não seja elevado, os valores de t estão muito próximos de zero, a probabilidade de erro aumenta na ordem de 10^3 e o intervalo de confiança de todas passa por zero, demonstrando que estas variáveis não foram significativas para o modelo.

A ANOVA da segunda precipitação, somente a variável PEG 1500 foi significativa para o modelo (Tabela 3). Entretanto, embora o efeito seja considerável, o erro padrão para este coeficiente aumenta na ordem de 10 vezes, com relação à mesma variável na primeira precipitação. O t se aproxima de zero e a probabilidade de erro também aumenta, ainda assim, o intervalo de confiança não passa por zero. Para as demais variáveis o erro padrão e principalmente a probabilidade de erro aumentam, o t se aproxima ainda mais de zero e todos os intervalos de confiança passam por zero.

As ANOVAs da terceira e da quarta precipitação não apresentaram nenhuma variável significativa, seja ela linear ou quadrática. Em ambas é possível observar pouco efeito das variáveis, alta probabilidade de erro, bem como elevado erro padrão. Em todos os casos t está próximo de zero e o intervalo de confiança passa por zero. Estes aspectos demonstram que estas duas precipitações não foram significativas para o modelo (Tabela 3).

O coeficiente de correlação ao quadrado corrigido R (ajustado) foi decrescente ao longo das precipitações: 0,86, 0,62, 0,09 e 0,16 para a primeira, segunda e terceira precipitações, respectivamente, demonstrando significância do modelo ajustado somente para a primeira precipitação.

Levando em consideração a atividade específica nas quatro etapas de purificação utilizando o planejamento fatorial completo, somente a primeira precipitação com PEG 1500 e PEG 4000 foi significativa. Além disso, somente a variável PEG 1500, nas concentrações testadas, foi eficiente na purificação da enzima dextranasacarase.

Ao observar as superfícies de resposta e as curvas padrão de cada uma das quatro precipitações (Figura 8), constata-se que apenas variável PEG 1500 apresentou significativo aumento ou diminuição na atividade específica com variações em sua concentração, ao passo que a variável PEG 4000 basicamente manteve valores quase sempre constantes de variações da atividade específica com variações em sua concentração. Este tipo de comportamento confirma o fato de a ANOVA ter indicado apenas a variável PEG 1500 como significativa.

Todas as precipitações apresentaram superfície de resposta e curva de contorno com perfis semelhantes, indicando que o maior aumento da atividade específica foi obtido com concentração de PEG 1500 entre 8 e 14%. Purama, Goyal, 2008, também obtiveram maior atividade específica em seu fracionamento com PEG 1500 10% (m/v).

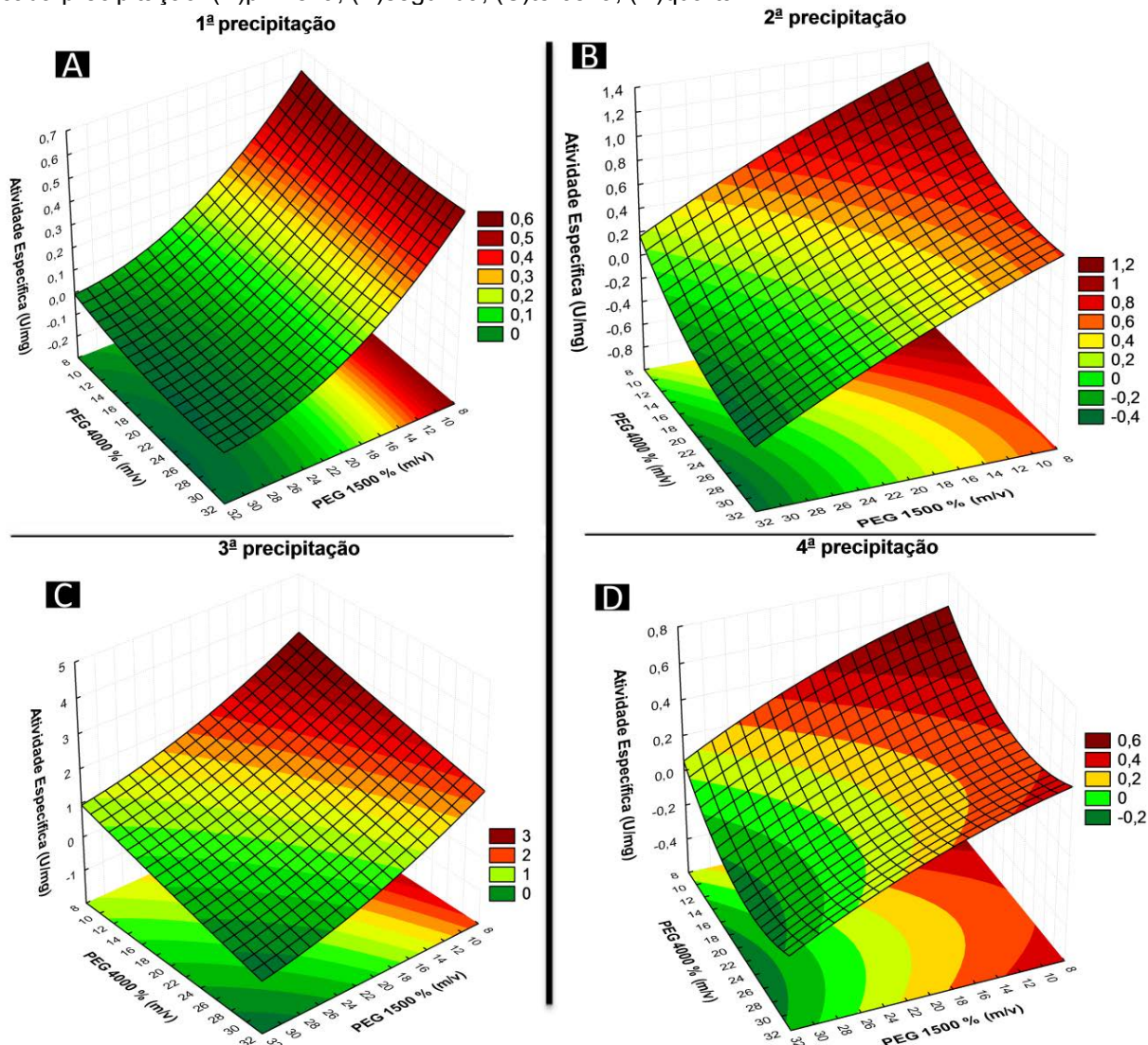
Tabela 3. Purificação da dextranasacarase FT 045B.

	Fator	Coefficiente	Erro Padrão	t(7)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança -95%
1ª precipitação	Mean/Interc.	0,179574	0,023787	7,54939	0,000132	0,123328	0,235821
	(1)PEG 1500 (L)	-0,51442	0,062288	-8,25877	0,000074	-0,661709	-0,367134
	PEG 1500 (Q)	-0,09164	0,046716	-1,96171	0,090591	-0,202109	0,018822
	(2)PEG 4000 (L)	-0,05107	0,062288	-0,81983	0,43933	-0,198353	0,096222
	PEG 4000 (Q)	-0,02436	0,046716	-0,52149	0,618116	-0,134827	0,086104
	R ²	0,91388					
	R ² -ajustado	0,86467					
2ª precipitação	Mean/Interc.	0,321831	0,086226	3,73242	0,007335	0,11794	0,525723
	(1)PEG 1500 (L)	-0,89659	0,225792	-3,97087	0,005386	-1,43051	-0,362679
	PEG 1500 (Q)	0,045477	0,169344	0,26855	0,796021	-0,35496	0,445912
	(2)PEG 4000 (L)	-0,52151	0,225792	-2,3097	0,054211	-1,05543	0,012403
	PEG 4000 (Q)	-0,12875	0,169344	-0,76028	0,471911	-0,52919	0,271686
	R ²	0,75593					
	R ² -ajustado	0,61647					
3ª precipitação	Mean/Interc.	1,2461	0,389621	3,19822	0,015103	0,32479	2,167403
	(1)PEG 1500 (L)	-1,98512	1,020268	-1,94569	0,092755	-4,39767	0,427426
	PEG 1500 (Q)	-0,2189	0,765201	-0,28607	0,783109	-2,02831	1,590515
	(2)PEG 4000 (L)	-1,16419	1,020268	-1,14106	0,291373	-3,57674	1,24836
	PEG 4000 (Q)	-0,01916	0,765201	-0,02504	0,980722	-1,82857	1,790252
	R ²	0,42556					
	R ² -ajustado	0,09732					
4ª precipitação	Mean/Interc.	0,149316	0,082157	1,81744	0,111988	-0,044955	0,343587
	(1)PEG 1500 (L)	-0,46612	0,215138	-2,16663	0,06695	-0,974846	0,042597
	PEG 1500 (Q)	0,043132	0,161354	0,26732	0,796931	-0,338409	0,424673
	(2)PEG 4000 (L)	-0,19289	0,215138	-0,89657	0,399732	-0,701607	0,315835
	PEG 4000 (Q)	-0,13222	0,161354	-0,81943	0,439548	-0,513758	0,249323
	R ²	0,46847					
	R ² -ajustado	0,1674					

Q = quadrático; L = linear

Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 8. Superfícies de resposta e respectivas curvas de contorno para o efeito das variáveis PEG 1500 e PEG 4000 sobre as diferenças de atividades específicas da dextranasacarase FT045B após cada precipitação: (A)primeira; (B)segunda; (C)terceira; (D)quarta.

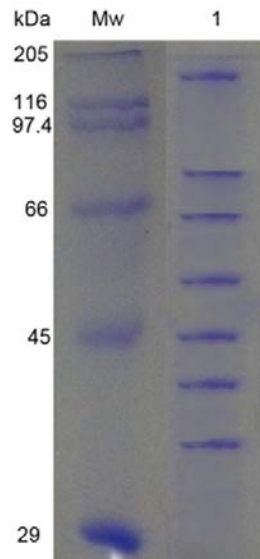


Fonte: Dados do próprio autor.

As amostras obtidas após as precipitações com PEG 1500 e PEG 4000 foram liofilizadas e analisadas em gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições desnaturantes para verificar a pureza da dextranasacarase FT045B. A Figura 9 apresenta o perfil de migração eletroforética da enzima dextranasacarase FT045B em caldo bruto livre de células, com aproximadamente 136 kDa (valor obtido pelo Figura 10) ao lado dos padrões moleculares.

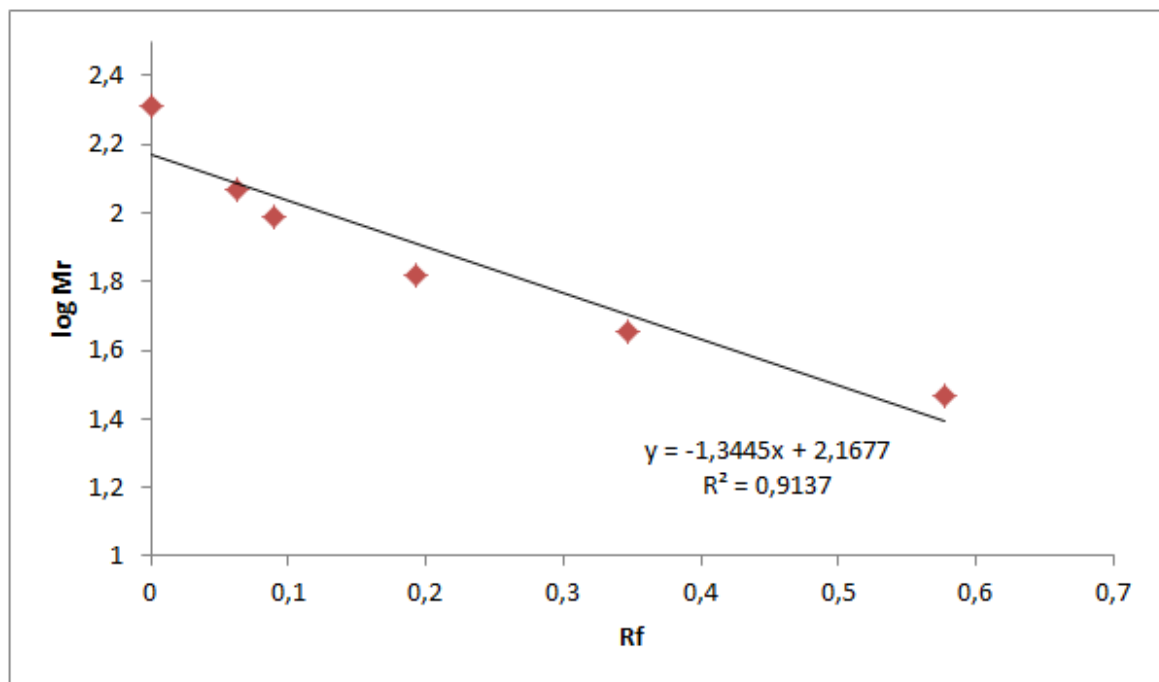
Fazendo a correlação do perfil de migração das proteínas conhecidas do marcador com a migração da dextranasacarase pode-se estimar a massa molecular da proteína estudada em 136 kDa, com base na equação da reta gerada pela Figura 10.

Figura 9. Análise por SDS-PAGE da enzima dextranasacarase FT045B em caldo bruto livre de células (colunas: Mw – Marcador de Massa Molecular (29-205 kDa), 1 – dextranasacarase FT045B).



Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 10. Curva padrão com os valores de log das massas dos padrões moleculares versus a razão distância percorrida por cada padrão/distância percorrida pelo corante para estimativa da massa molar da enzima dextranasacarase.



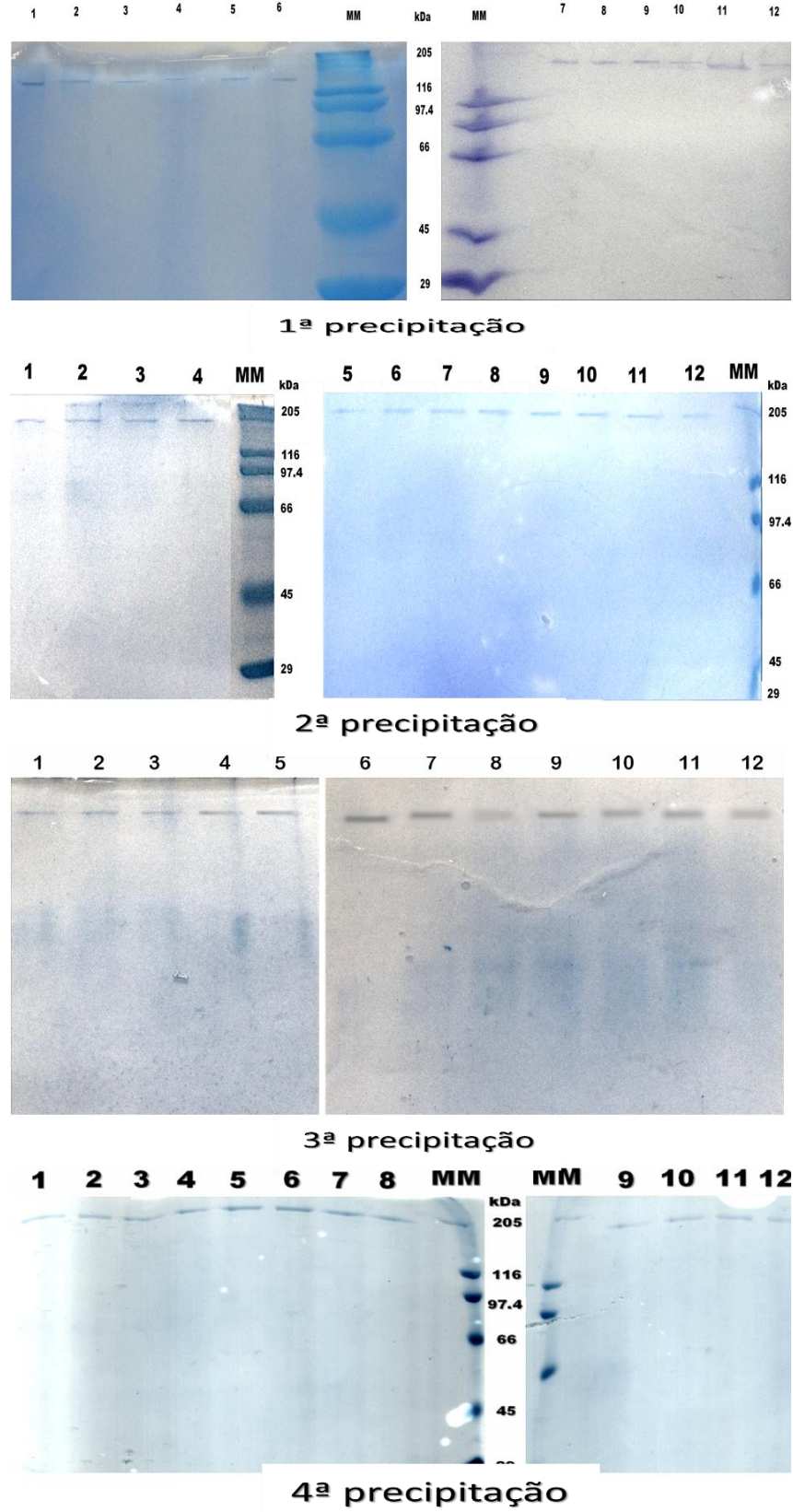
Fonte: Dados do próprio autor.

A Figura 11 representa as análises por SDS-PAGE das amostras obtidas após cada precipitação. É interessante notar que logo após a segunda precipitação as amostras parecem estar puras, pois não é possível visualizar bandas de outras proteínas, como na Figura 9, referente ao caldo bruto. Apesar desta aparente pureza, acredita-se na existência de outras proteínas, contudo em concentrações não detectáveis pelo gel de acrilamida, pois analisando a tabela 2 ou a Figura 7, é possível constatar o aumento da atividade específica até a terceira precipitação, comprovando que proteínas não desejadas estavam presentes até este momento, sendo eliminadas aos poucos pelas etapas consecutivas de precipitação.

As bandas no gel de eletroforese das amostras referentes à primeira precipitação com polietilenoglicol estão bastante fracas (Figura 12), e em algumas amostras como 3, 4, 6, 9 10 e 12, difíceis de visualizar. Possivelmente isto se deve à baixa concentração da dextranasacarase. Já os géis das amostras das precipitações seguintes se apresentam bem mais definidas e com coloração mais marcante, contudo é difícil visualizar diferenças de intensidade de cada banda referente a cada experimento, pois como se pode comprovar pelos dados da tabela 2, existe uma pequena diferença entre os valores de atividade enzimática de cada experimento, e a detecção visual destas bandas no gel se torna difícil.

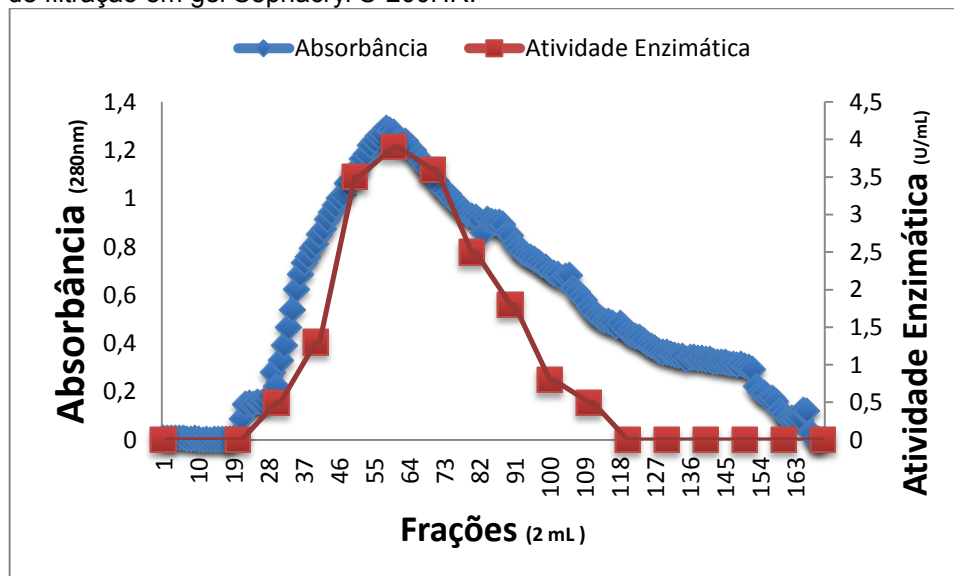
A primeira precipitação com 10% de PEG 1500 e 20% de PEG 4000 (experimento 2) foi considerado o procedimento que propiciou melhor rendimento (30%) da atividade a partir do caldo bruto, desta forma, a enzima obtida nesta etapa foi dialisada em tampão piridina/acetato 20 mM (pH 5,20) e aplicada em uma coluna de vidro, contendo Sephacryl S-200HR com 40 mL de volume equilibrado com o mesmo tampão da diálise. A enzima foi eluída a um fluxo de 0,2 mL/min e as amostras de 2 mL coletadas, foram analisadas em espectrofotômetro (280 nm) para detectar a presença de proteínas (Figura 13). As frações que apresentaram maiores absorbâncias foram agrupadas e analisadas quanto à atividade específica. As amostras que apresentaram melhores resultados foram liofilizadas e analisadas por SDS-PAGE.

Figura 11. SDS-PAGE das precipitações com diferentes combinações de PEG's de dextranasacarase FT045B. (colunas: MM – Marcador de Massa Molecular (29-205 kDa); 1 – 12 amostras dos experimentos de 1 ao 12, respectivamete).



Fonte: Dados do próprio autor

Figura 12. Absorbância e Atividade Enzimática das frações de dextranasacarase FT045B, coletadas da coluna de filtração em gel Sephacryl S-200HR.



Fonte: Dados do próprio autor

Houve decréscimo no rendimento (de 30,1 para 19,5%) após submeter a amostra à cromatografia de filtração em gel, quando comparado com a primeira precipitação, sendo que a atividade específica se manteve em 0,8 U/mg (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo dos resultados obtidos com a purificação da enzima dextranasacarase FT045B por filtração em gel Sephacryl S-200HR

Etapa	Volume (mL)	Atividade Enzimática (U)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
caldo bruto	180,0	984,6	3139,2	0,3	100,0	1,0
1ª precipitação	58,0	296,1	350,9	0,8	30,1	2,7
Sephacryl SH-200	160,0	192,0	239,3	0,8	19,5	2,6

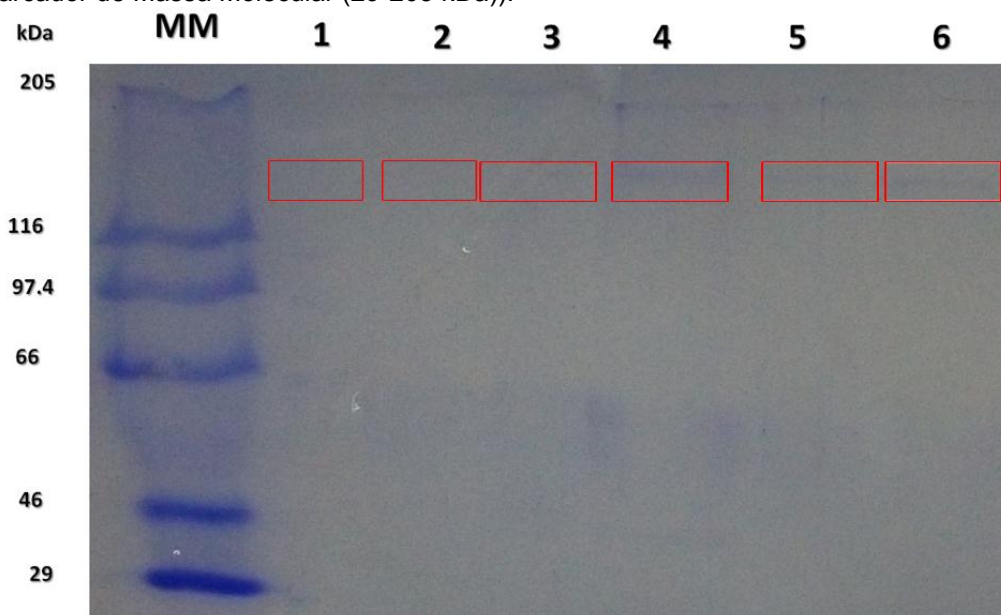
Fonte: Dados do próprio autor

Como já mencionado, aparentemente as amostras analisadas por SDS-PAGE apresentaram perfil de amostra purificada, após a primeira precipitação. Um novo indício deste comportamento é visto nesta etapa de filtração em gel, em que um único pico de absorbância é registrado após a leitura das frações coletadas da coluna. Outro fator importante é que a atividade específica não se alterou (0,8 U/mg) comparando com o valor obtido na etapa anterior.

Purama, Goyal, (2008), também obtiveram melhor resultado com apenas uma precipitação com PEG 1500 (10%) e também conduziram a filtração em gel a partir desta etapa.

As frações que apresentaram maior atividade enzimática foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 13).

Figura 13. SDS-PAGE das frações agrupadas que apresentaram maior atividade enzimática. (colunas: 1 – Fração 30; 2 – Fração 40; 3 – Fração 80; 4 - Fração 60; 5 – Fração 50; 6 – Fração 70; MM – Marcador de Massa Molecular (29-205 kDa)).



Fonte: Dados do próprio autor

A fração 60 foi analisada em gel de acrilamida não denaturante para determinação da atividade *in situ* da dextranasacarase. Um gel foi incubado em solução de sacarose 10%, para comprovar a presença de glicosiltransferase e o outro, em solução de rafinose 5%, um substrato específico para frutossiltransferases (inulansucrase e levansucrase), para excluir a presença de frutossiltransferases. O gel incubado em sacarose apresentou uma banda magenta larga, ao passo que nenhuma banda foi observada no gel incubado em rafinose, comprovando desta forma que a enzima dextranasacarase purificada é uma glicosiltransferase e não uma frutossiltransferase (Figura 14).

Figura 14. Gel de acrilamida não denaturante para determinação da atividade *in situ* da dextranasacarase (A) incubado em sacarose (B) incubado em rafinose.



Fonte: Dados do próprio autor

3.4 Conclusão

Após análise por SDS-PAGE, foi constatado que a enzima dextranasacarase FT045B apresenta massa molar de aproximadamente 136 kDa.

Houve um decréscimo no rendimento (%) da enzima após cada precipitação com PEG devido à diminuição da quantidade de dextrana na amostra.

A ANOVA dos resultados de atividade específica das quatro etapas de purificação mostrou que somente a primeira precipitação com PEG 1500 e PEG 4000 foi significativa. Além disso, somente a variável PEG 1500, nas concentrações testadas, foi eficiente na purificação da enzima dextranasacarase.

Todas as precipitações apresentaram superfície de resposta e curva de contorno com perfis semelhantes, indicando que o maior aumento da atividade específica foi obtido com concentração de PEG 1500 entre 8 e 14%.

A primeira precipitação com 10% de PEG 1500 e 20% de PEG 4000 (experimento 2) foi considerado o procedimento que propiciou melhor rendimento

(30%) da atividade a partir do caldo bruto, desta forma, a enzima obtida nesta etapa foi dialisada e aplicada em uma coluna de vidro, contendo Sephacryl S-200HR.

Houve decréscimo no rendimento (de 30,1 para 19,5%) após submeter a amostra à cromatografia de filtração em gel, quando comparado com a primeira precipitação, sendo que a atividade específica se manteve em 0,8 U/mg.

Foi confirmado que a enzima dextranasacarase purificada é uma glicosiltransferase e não uma frutossiltransferase, pela análise de atividade em gel de acrilamida sob condições não denaturantes.

4. PRODUÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO

α -GLICOSÍDEO

O ácido ascórbico é um dos antioxidantes mais potentes atuantes nos sistemas biológicos, eliminando compostos ativos oxigenados e radicais livres e tem se mostrado bastante útil na aplicação na pele, contudo é altamente instável quando exposto ao calor, à luz e perde seus efeitos benéficos quando exposto ao ar.

A estratégia deste estudo para driblar a instabilidade do ácido ascórbico, direcionando a aplicação do novo composto ao uso tópico, seria a realização de reação de transglicosilação enzimática do ácido ascórbico, utilizando um dos mais simples e baratos doadores, a sacarose. A reação de transglicosilação foi catalisada pela dextranasacarase purificada, produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, que catalisa a tão chamada reação aceptor, gerando ácido ascórbico α -glicosídeos.

Após a purificação da enzima dextranasacarase FT045B produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, a reação de transglicosilação foi conduzida, utilizando as condições de reação já previamente reportadas por (KIM et al., 2010). Após o término da reação, alíquotas da reação foram aplicadas em placas de cromatografia em camada delgada e eluídas com solvente apropriado. Após a separação dos produtos e subprodutos, o composto AA-2G foi extraído da sílica utilizada na cromatografia e caracterizado por espectrometria de massas.

4.1 Revisão bibliográfica

4.1.1 Vitamina C

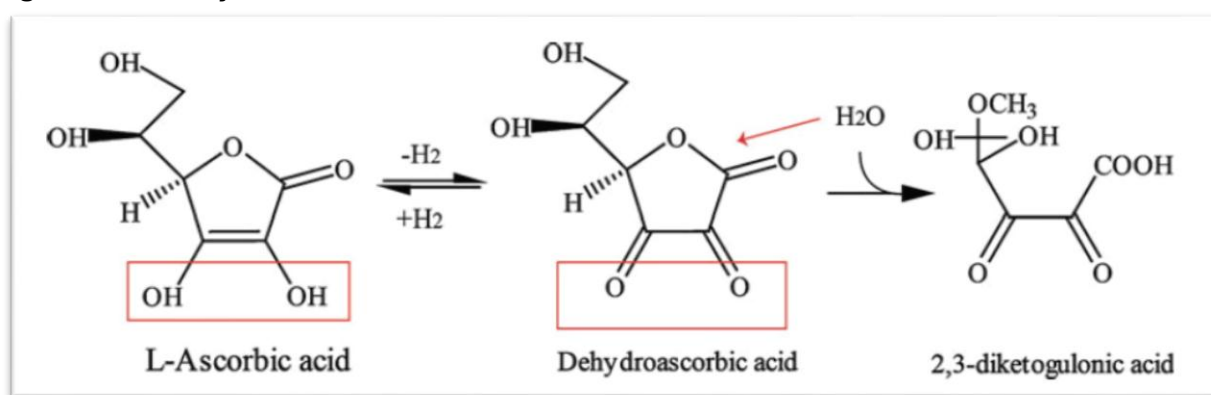
O ácido ascórbico (Vitamina C) é um nutriente extremamente importante para a fisiologia humana. Ele protege o cérebro e a medula espinhal dos radicais livres e promove a síntese de colágeno. É também essencial para a manutenção do sistema imunológico. A vitamina C é tóxica para uma ampla faixa de células cancerígenas, especialmente o melanoma. A oxidação enzimática da tirosina que catalisa a ação aeróbica da tirosina em melanina e outros pigmentos é inibida pela presença da Vitamina C. A Vitamina C tem se mostrado efetiva como catalisador da resposta imunológica a muitas infecções de bactérias e de vírus (HAN et al., 2012).

A relevância da aplicação tópica é especialmente pertinente com relação à proteção UV, tratamento de melanoma, síntese de colágeno e proteção contra danos químicos associados ao uso de cigarros, nicotina, monóxido de carbono, compostos nitrosos (óxidos nítricos, ácidos nítricos gasosos), cádmio e hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, além de aumentar a imunidade das células da pele ajudando no combate à acne. O ácido ascórbico é um dos antioxidantes mais potentes atuantes nos sistemas biológicos, eliminando compostos ativos oxigenados e radicais livres. O ácido ascórbico é um antioxidante solúvel em água, que tem efeito de branqueamento, além de promover a síntese do colágeno (DAVIDSON et al., 1997). Estes radicais livres estão envolvidos nas causas desde queimaduras pelo sol até o envelhecimento. Eles destroem membranas lipídicas, danificam o DNA e inativam enzimas.

A Vitamina C é um nutriente essencial que não pode ser sintetizada pelo corpo humano (RUMSEY; LEVINE, 1998) e a perda de vitamina C faz com que nosso organismo desenvolva muitas doenças crônicas, incluindo problemas de coração, câncer, doenças nos olhos e degeneração dos neurônios além de causar escorbuto (JACOB; SOTOUDEH, 2002).

Devido a sua extrema instabilidade, vários derivados deste composto têm sido desenvolvidos com a intenção de aumentar a estabilidade, mantendo a mesma atividade biológica, como o fato de ser um excelente antioxidante (FUJINAMI; TAI; YAMAMOTO, 2001), auxiliar na formação do colágeno, absorção do ferro e na síntese de carnitina (ENGLARD; SEIFTER, 1986; NAIDU, 2003). A instabilidade da Vitamina C em solução aquosa, especialmente sob condições oxidativas, tais como calor, luz, presença de íons metálicos e da ascorbato oxidase, resulta na degradação irreversível da molécula (Figura 15).

Figura 15. Oxidação do ácido ascórbico



Fonte: Lupo, (2001)

O ácido ascórbico é altamente instável quando exposto ao calor, à luz e perde seus efeitos benéficos quando exposto ao ar quando aplicado à pele. O potencial do ácido ascórbico se degrada devido a sua conversão em ácido dehidroascórbico, que é uma forma inativa da vitamina C. Muitos produtos no mercado contêm ácido ascórbico em solução aquosa, apresentando estabilidade incrivelmente baixa. A solução se degrada em apenas alguns dias (LUPO, 2001; CHIU; KIMBALL, 2003; SORG; ANTILLE; SAURAT, 2004).

Devido a esta instabilidade, vários grupos de pesquisa têm tentado desenvolver estratégias que façam com que derivados de ácido ascórbico sejam mais estáveis, mantendo sua ação antioxidante como o fosfato e sulfato de acil-ascorbato (MEAD; FINAMORE, 1969; MIMA et al., 1970; WATANABE et al., 2002), palmitato de ascorbil (DRESSER et al., 2002; HSIEH; NAIR; WU, 2006), metil etil ascorbato (LU et al., 1984), e ascorbil glicosídeo (YAMAMOTO; MUTO; MURAKAMI; et al., 1990), embora muitos destes não funcionem bem como antioxidantes ou como

liberadores do L-ácido ascórbico *in vivo*. Um destes derivados mais importantes é o ácido L-ascórbico 1-O-D-glicopiranozídico (AA-2G), e tem atraído bastante interesse das indústrias cosméticas, alimentícias e farmacêuticas.

Em comparação com outros derivados do ácido ascórbico, o AA-2G apresenta muitas vantagens, como o fato de ser facilmente absorvido pelo organismo humano, como pela pele, por exemplo, além de liberar facilmente o L-ácido ascórbico e a D-glicose, que são ambos também facilmente absorvíveis pelo organismo (KOUKI et al., 1992; JUN; BAE; KIM, 2001) . A síntese o AA-2G pode ser pela de reação enzimática, sendo mais interessante do ponto de vista de custo de produção, regioespecificidade alta, e simples. Por estas razões listadas, o AA-2G tem sido considerado o melhor derivado da vitamina C e por isto tem recebido mais atenção (HAN et al., 2012).

O L-ácido ascórbico glicosídeo é um importante derivado do ácido ascórbico, além de vários outros derivados glicosídicos do ácido ascórbico (LI; SHI, 2007). O 2-, 3-, 5- e o 6-grupos hidroxílicos do L-ácido ascórbico foram modificados por diferentes reações químicas ou biológicas. Nos parágrafos seguintes, há a descrição das estruturas: 5-O-D-glicopiranosil-L ácido ascórbico (AA-5G); 6-O-D-glicopiranosil-L-ácido ascórbico (AA-6G); 3-O-glicosil-L- ácido ascórbico (AA-3G); 2-O-DR glicopiranosil-L-ácido ascórbico (AA-2G); and 6-O-acil-2-O-D- glicopiranosil-L-ácido ascórbico (6-acil-L-ácido ascórbico-2G).

Os L-ácido ascórbico glicosídeos, incluem o AA-5G, AA-6G, AA-3G, AA-2G, e o 6-acil-L-ácido ascórbico-2G (LI; SHI, 2007; MUTO et al., 1991; YAMAMOTO et al., 1992). O AA-5G apresenta uma modificação no carbono C-5, dissolve facilmente em solução aquosa, 0,1M de NaOH, ou 0,1 M de ácido acético e dissolve-se rapidamente em metanol ou etanol, contudo é insolúvel em éter dietílico e benzeno. O AA-2G também pode ser facilmente reduzido gerando uma reação colorida, apresentando maior estabilidade em solução aquosa que o L-ácido ascórbico (MANDAI; YONEYANMA; SAKAI, 1993).

Suzuki, Miyake, Uchida, Mino, (1973) produziram o AA-6G por transglicosilação da maltose no C-6 do L-ácido ascórbico com *Aspergillus niger* α -glicosilase. O AA-6G é mais estável e mais redutor que o L-ácido ascórbico, apesar

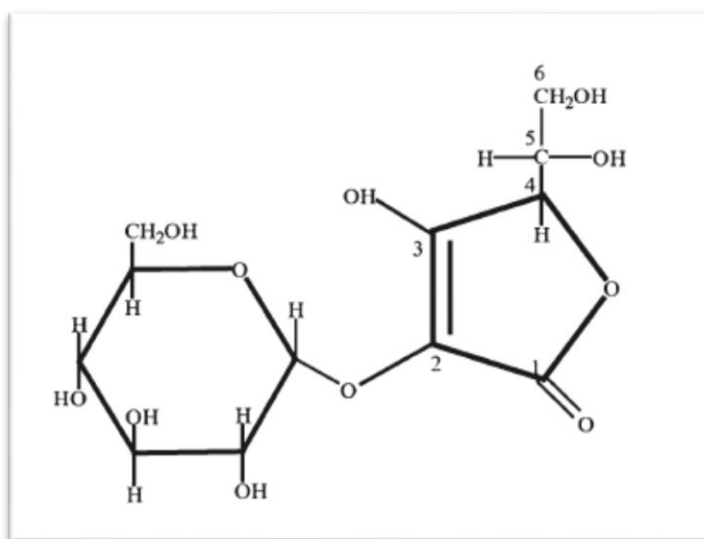
de não ser mais estável quando em solução aquosa e de seu glicosídeo não ser totalmente absorvido *in vivo* (LI, H; SHI, 2007).

Yamamoto and Muto, (1992), prepararam o AA-3G por proteção dos grupos 5,6-hidroxílicos do L-ácido ascórbico e acoplamento com 1-haloacilglicosil, obtendo o intermediário 3-O-(acilglicosil)-(5,6-O-isopropilidina)-L-ácido ascórbico, seguido de remoção da isopropilidina e do acil dos intermediários, obtendo o composto AA-3G. Embora este composto apresente função fisiológica melhor que os outros derivados glicosídicos, incluindo AA-2G, ele ainda está em fase de pesquisa e muito estudo ainda deve ser feito para se realizar uma produção industrial.

O 6-acy L-ácido ascórbico-2G é produzido por modificações moleculares do AA-2G, como o 6-butilril-ácido ascórbico-2G, 6-caproil-ácido ascórbico-2G, 6-capriloil L-ácido ascórbico-2G, and 6-octadecanoil L-ácido ascórbico-2G (TAI et al., 2002; YAMAMOTO et al., 2002). Com aumento dos grupos acetílicos, a estabilidade e a atividade de varredura de radicais do 6-acyL-ácido ascórbico-2G aumenta (FUJINAMI; TAI; YAMAMOTO, 2001; TAI et al., 2002; TAKEBAYASHI; TAI; YAMAMOTO, 2002). O 6-acyL-ácido ascórbico-2G é superior a outro derivado do ácido ascórbico em termos de atividade de varredura de radicais.

O AA-2G é preparado pela transferência de um resíduo glicosídico da ligação α -(1,4)-glucana para a posição C-2 do ácido ascórbico, através de ligação α -(1,2) (Figura 16). As propriedades físico-químicas do AA-2G são: fórmula $C_{12}H_{18}O_{11}$; massa molar de 338,26 Da; absorção ultravioleta λ_{max} 238 nm em pH 2,0 e 260 nm em pH 7,0; cristais com estruturas em pilares e incolores. Devido a sua alta termoestabilidade e incapacidade de ser oxidado, o AA-2G tem se tornado um dos derivados do ácido ascórbico que tem atraído maior atenção (HAN et al., 2012).

Figura 16. Estrutura do AA-2G



Fonte: HAN et al., (2012)

4.1.2 Funções e aplicações do AA-2G

Como um derivado do ácido ascórbico, o AA-2G apresenta quase toda a bioatividade do ácido ascórbico *in vivo*. Quando produtos que contenham AA-2G são usados na pele, a ação gradual da α -glicosilase libera o ácido ascórbico, promovendo a ação constante e prolongada dos benefícios do ácido ascórbico. O AA-2G pode promover a produção de anticorpos e a síntese do colágeno devido a sua integridade estrutural, desta maneira ele atua de forma importante na manutenção da elasticidade da pele e na reparação tecidual (YAMAMOTO; TANAKA; MUTO, 1993).

Devido a sua proteção ao C-2 glicosídico, o AA-2G é extremamente estável em resposta à prolongada oxidação e ao aquecimento em solução aquosa e não é redutível na sua forma intacta (YAMAMOTO; MUTO, 1992).

A principal aplicação do AA-2G é em cosméticos. Devido a sua ação não redutora e suas propriedades antioxidantes, AA-2G evita o problema que o L-ácido ascórbico tem ao ser diretamente incorporado à solução aquosa cosmética. Além disso, o AA-2G mostra mais ação fisiológica salutar que o L-ácido ascórbico em termos de síntese de colágeno e inibição da citotoxicidade porque não tem nenhum efeito inibitório nas células e é muito mais estável (YAMAMOTO et al., 1992; YAMAMOTO; TANAKA; MUTO, 1993; KUMANO et al., 1998). Em comparação com os derivados convencionais, o AA-2G mostrou melhor capacidade de inibição da

síntese de melanina em células B16 de melanoma (KUMANO et al., 1998). Portanto, o AA-2G tem sido usado como ingrediente de tratamento de pele primária e como aditivo médico em cosméticos comerciais (TAKEBAYASHI; TAI; YAMAMOTO, 2002).

O AA-2G é facilmente processado por enzimas, tais como α -glicosidase para libertar L-ácido ascórbico ativo *in vivo* e *in vitro*. Assim, muitas vezes, imita os efeitos fisiológicos de L-ácido ascórbico em produtos médicos e de cuidados com a saúde. Por exemplo, Yamamoto et al., (1990) descobriram que o AA-2G tinha atividade antiescorbuto em cobaias e a síntese de colágeno estimulada em culturas de fibroblastos de pele humana (YAMAMOTO; MUTO, 1992).

Miyai et al., (1996) descobriram que o AA-2G é um composto mais eficaz que vários outros derivados de L-ácido ascórbico na prevenção de eritema induzido por UV na pele humana e porco guiné. AA-2G foi também essencial para a redução da lesão actínica e pode suprimir significativamente as citotoxicidades de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido produzido pela xantina e xantina oxidase (MIYAI et al., 1996). O AA-2G também previne a lesão das células epidérmicas pela indução positiva da capacidade celular antioxidante (MIYAI et al., 1996). Além disso, ele potencializa a função das células B no sistema imune humoral de anticorpos, porque aumenta a produção em esplenócitos cultivados através de uma suplementação contínua de L-ácido ascórbico (YAMAMOTO; TANAKA; MUTO, 1993).

Recentemente, Taniguchi et al., (2012) descobriram que o AA-2G poderia proteger fibroblastos dérmicos do estresse oxidativo e do envelhecimento celular. O AA-2G também atua efetivamente nos radicais induzidos por radiação e protege contra radiação de raios gama local (KINASHHI et al., 2010). Portanto, o AA-2G tem um grande potencial na área da saúde e indústrias médicas.

O AA-2G também tem potencial na criação de animais e na cultura aquática. (MUTO et al., 1991; YAMAMOTO; TANAKA; MUTO, 1993). O ácido ascórbico é indispensável para o crescimento de animais jovens e pode prevenir ou tratar muitas doenças, incluindo doenças de pele e escorbuto. Devido à sua instabilidade, o ácido ascórbico é raramente usado na forragem diretamente. Em vez

disso, o AA-2G é amplamente adicionado à forragem como componente importante devido à sua estabilidade. Além disso, como um derivado de L-ácido ascórbico, AA-2G retém a maioria das funções biológicas e fisiológicas do ácido ascórbico por isso pode ser utilizado em quase todas as aplicações do ácido ascórbico.

4.1.3 Produção de AA-2G por biotransformação

No momento, biotransformação é o principal método para a produção do AA-2G. Embora Toyoda-ono et al., (2004) tentaram sintetizá-lo por uma abordagem química. Eles descobriram que o procedimento era muito complicado, portanto inadequado para produção em larga escala.

A produção de AA-2G por biotransformação foi compartilhada pelo Hayashibara Biochemical Laboratories of Japan e pelo Departamento de Farmacologia da Universidade de Okayama (AGA et al., 1991; YAMAMOTO; MUTO; MIYAKE, 1998). A transformação foi catalisada por cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase) com α -ciclodextrina e L-ácido ascórbico como substrato, e a pureza de AA-2G pode atingir 97% (AGA et al., 1991), assim agora, cinco enzimas têm sido utilizadas para a produção de AA-2G, incluindo α -glucosidase (EC 3.2.1.20) (MUTO et al., 1990), CGTase (EC 2.4.1.19) (AGA et al., 1991), amilase (EC 3.2.1.1) (LEE et al., 2004), sacarose-fosforilase (EC 2.4.1.7) (KWON; KIM; LEE, 2007), e α -isomaltosyl glucosaccharideforming enzima (MUKAI et al., 2005).

A α -glicosidase derivada do intestino de rato e de sementes de milho catalisaram primeiramente a síntese do AA-2G (MUTO et al., 1990; YAMAMOTO; MUTO; NAGATA; et al., 1990). No processo de biossíntese, o glicosídeo proveniente da maltose foi transferido para o L-ácido ascórbico pela α -glicosidase. Esta enzima pode ser obtida de muitas fontes, incluindo animais (rins e intestino de rato e intestino de cão e de porco), plantas (semente de milho) e micro-organismos (*Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, e *Saccharomyces*) (YAMAMOTO; MUTO; MIYAKE, 1998). Comparado com as enzimas extraídas de animais ou plantas, as enzimas produzidas por fermentação microbiana tem muita superioridade: como o processo

de produção simples, de baixo custo e curto ciclo de produção, e a potencialidade para a produção em larga escala.

Atualmente, *A. niger* é o micro-organismo utilizado para a produção de α -glicosidase. Para melhorar o rendimento da enzima, muitas α -glicosidases recombinantes foram investigadas. Por exemplo, α -glicosidase de *Aspergillus niger* foi expressa em *Aspergillus nidulans* (NAKAMURA et al., 1997) e *Emmericella nidulans* (OGAWA et al., 2006), e o nível de expressão foi avaliado de 0,04 e 0,96 U/mg; respectivamente. Chen et al., (2010) expressou o gene da α -glicosidase de *A. niger* em *Pichia pastoris* e a atividade da enzima no sobrenadante da cultura de uma fermentação de 3 L atingiu 2,07 U/mL.

Para a biossíntese do AA-2G com α -glicosidase como catalisador, alguns produtos intermédios são gerados, mas a eficiência de síntese de AA-2G é baixa porque a α -glicosidase pode catalisar a hidrólise de AA-2G ao mesmo tempo (YAMAMOTO; MUTO; MIYAKE, 1998).

A CGTase é considerada a melhor enzima para a produção em larga escala de AA-2G, devido à sua alta especificidade de substrato (TANAKA; MUTO; YAMAMOTO, 1991). A fermentação microbiana é a principal fonte para a produção de CGTase, e os principais micro-organismos incluem *Paenibacillus macerans*, *Bacillus* sp., e *Bacillus circulans*. Geralmente a atividade de CGTase a partir das estirpes do tipo selvagem é muito baixa. Por exemplo, a atividade de CGTase de *Bacillus firmus* foi apenas 7,05 U/mL (GAWANDE et al., 1998), e de *Bacillus cereus* foi de 106 U/mL sob as condições ótimas (JAMUNA et al., 1993).

A fim de melhorar o rendimento da enzima, o gene da enzima CGTase de *P. macerans* foi expressa em *Escherichia coli* (LI et al., 2010), e o rendimento da enzima CGTase extracelular recombinante CGTase atingiu 275,3 U/mL (CHEN et al., 2011), que foi o maior já descrito.

Quando a CGTase é utilizada para catalisar a biossíntese de AA-2G, α - e β -ciclodextrinas são frequentemente utilizadas como doadores glicosídicos. Muitos dos produtos intermédios, tais como AA-2Gn ("n" significa o número de glicosídios ligados ao L-ácido ascórbico), são produzidos, juntamente com o AA-2G, e assim, o tratamento posterior com glucoamilase é necessário. O transglicosilação

para a produção de AA-2G usando CGTase de *Paenibacillus* sp. foi estudada (JUN; BAE; KIM, 2001), e a quantidade de AA-2G produzida foi de 2,987 g/L em condições ideais de transformação. (PROUSOONTORN; PANTATAN, 2007), produziram AA-2G usando CGTase imobilizada com alumina como veículo. O rendimento de AA-2G foi de 2,92% e a CGTase imobilizada manteve atividade até 74,4% de sua atividade catalítica inicial. ZHANG et al., (2011a) utilizaram primeiro CGTase a partir de *E. coli* recombinante para produzir AA-2G e estudaram o processo de otimização de enzimática da produção de AA-2G. Neste sistema, a produção de AA-2G máxima chegou a 13 g/L. Depois que a CGTase foi imobilizada pelo alginato de sódio, a quantidade de AA-2G atingiu os 21 g/L, a produção mais elevada já registrada (ZHANG et al., 2011b).

A α -amilase pode ser produzida a partir de várias bactérias (especialmente *Bacillus*), leveduras e fungos filamentosos. É geralmente preferível a amilase fúngica (PANDEY et al., 2000).

A atividade de α -amilase atingiu 26.350 U/g de farelo bacteriano seco de *Bacillus coagulans* em fermentação em estado sólido (BABU; SATYANARAYANA, 1995) e chegou a 16,42 UI por *Bacillus* sp. (TANYILDIZI; OZER; ELIBOL, 2005).

Hoje em dia, a produção industrial de α -amilase é realizada. No entanto, a síntese de AA-2G por α -amilase é inferior a CGTase devido à sua pobre especificidade de substrato.

As outras duas outras enzimas [sacarose-fosforilase, (Spase) e a enzima α -isomaltosyl glucosaccharide-formadora, (IMGase)] também foram usadas para catalisar a síntese de AA-2G.

A formação de AA-2G por Spase de *Bifidobacterium longum* foi primeiramente relatada por (KWON; KIM; LEE, 2007). Embora a Spase não tenha sido utilizada para produzir AA-2G em grande escala, pode utilizar a sacarose como um doador de glicosídico, e esta fornece um novo método para a preparação de AA-2G.

O método que usa a IMGase de *Arthrobacter globiformis* para produzir AA-2G também foi relatada (KUBOTA et al., 2007; MUKAI et al., 2005). A vantagem

desta enzima é que o produto tem pouco (ou nenhum) subproduto. No entanto, esta enzima ainda está sendo estudada em laboratório, e nenhuma IMGase está disponível comercialmente.

Resultados semelhantes também foram relatados na literatura (AGA et al., 1991; JUN; BAE; KIM, 2001; ZHANG et al., 2011a). No entanto, o custo da α -ciclodextrina é muito elevado e a β -ciclodextrina é insolúvel em solução aquosa, então ambas são inadequados para produção em larga escala de AA-2G. A especificidade do substrato da α -glicosidase é superior a CGTase porque pode utilizar maltose como um doador glicosídico, mas a dificuldade de purificação do AA-2G é aumentada, devido às elevadas concentrações dos subprodutos AA-6G. Portanto, a obtenção de um elevado rendimento de AA-2G usando maltose como um doador de glicosídico é um atraente desafio, porque a maltose é facilmente dissolvida em água e é de baixo custo. Para resolver este problema, é necessário melhorar a especificidade do substrato e do produto através de estratégias de design racionais e semi-rationais com glicosiltransferases.

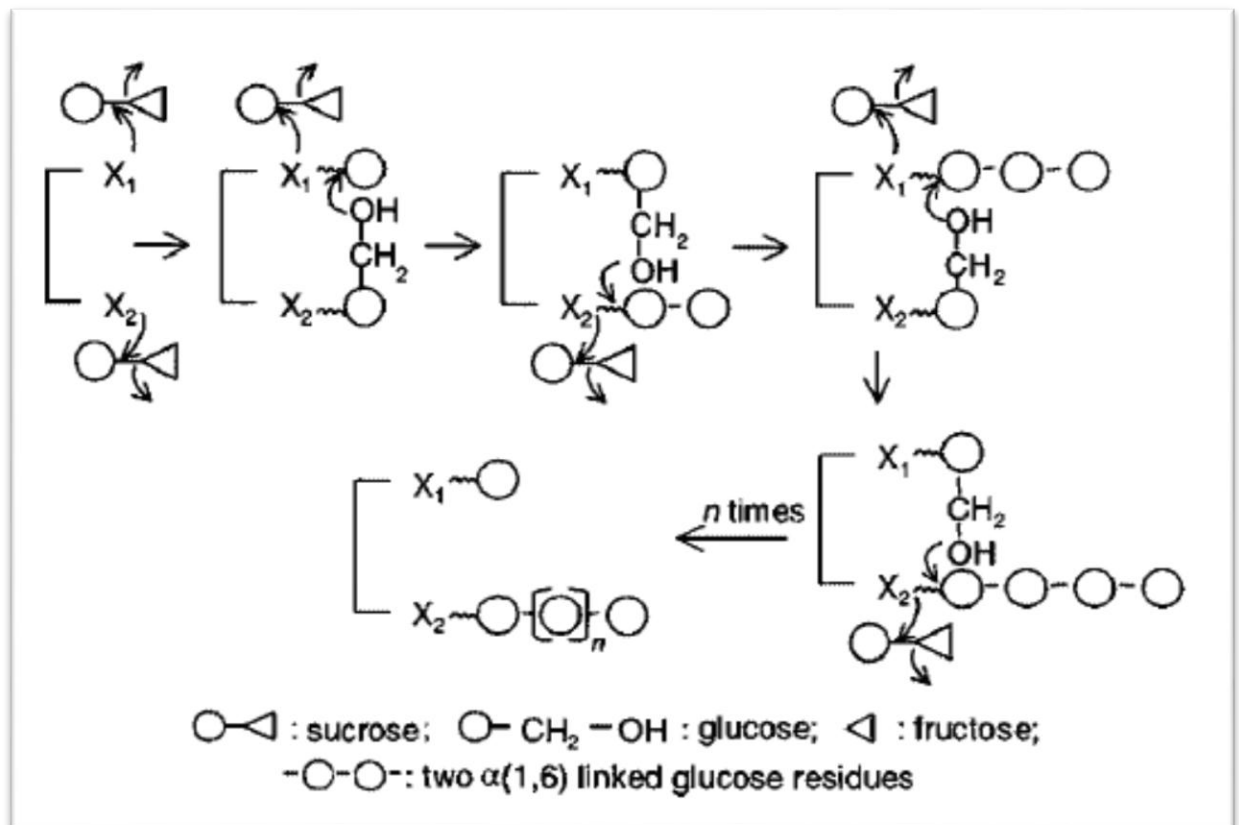
Após a reação ocorrer, não somente o produto de AA-2G está presente na solução, mas também de L-ácido ascórbico e sacarídeos. Para purificar o AA-2G são necessárias separação e purificação. A troca iônica (YAMASAKI; NISHI; MIYAKE, 2001) e a eletrodialise são os dois principais métodos utilizados. Na troca iônica, a solução de reação desmineralizada é primeiramente submetida a uma coluna de resina de troca aniônica. Subsequentemente, o AA-2G é adsorvido e o L-ácido ascórbico e os sacarídeos são removidos por eluição com soluções, tais como HCl, H₂SO₄, HNO₃, NaCl, KCl, Na₂SO₄, NaNO₃, ácido cítrico, sódio e ácido cítrico.

Eletrodialise (AGA; YONEYAMA; SAKAI, 1994) é outro método para separar e purificar AA-2G. A eletrodialise consiste em uma membrana de permuta aniônica utilizada para permitir que a L-ácido ascórbico permeie a membrana, para separar L-ácido ascórbico de AA-2G ou para permitir que o AA-2G permeie a membrana para separar AA-2G dos sacarídeos.

4.1.4 Reação Aceptor com a dextranasacarase: para entender melhor a reação de transglicosilação de formação do AA-2G

Estudos sobre mecanismos têm mostrado que a dextrana B-512F, que é sintetizada a partir de sacarose pela dextranasacarase, é formada via intermediários glicosídios. A metade glicosídica é transferida para o final redutor da cadeia glucanósídica em crescimento, sendo ligado covalentemente ao sítio ativo da enzima (NAESSENS et al., 2005). O mecanismo proposto por Robyt e colaboradores para a síntese de uma sequência de resíduos de glicose unidos por ligações α -(1,6) na dextrana B-512F envolve dois nucleófilos no sítio ativo, que atacam a sacarose e libera frutose gerando dois intermediários β -glicosídicos (Figura 17) (ROBYT; EKLUND, 1982; ROBYT, 1996).

Figura 17. Mecanismo proposto para a síntese de glucana α -(1,6) por dextranasacarase B-512F. X_1 e X_2 representam nucleófilos no sítio ativo da enzima.



Fonte: Robyt, (1985).

De acordo com Robyt; Eklund, (1982) e Robyt, (1996) o grupo OH do C-6 de um resíduo de glicose ataca o C-1 de outro para formar a ligação α -(1,6) e um resíduo de glicose é transferido para outro. O nucleófilo liberado ataca outra

molécula de sacarose formando um novo intermediário glicose-enzima. O grupo OH do C-6 deste novo intermediário ataca o C-1 da unidade isomaltosídica (que é a cadeia de dextrana em crescimento), a qual é transferida para o resíduo glicosídico. As unidades glicosídicas e dextranosídicas são alternadamente transferidas entre os dois nucleófilos assim que a cadeia da dextrana é formada no final redutor.

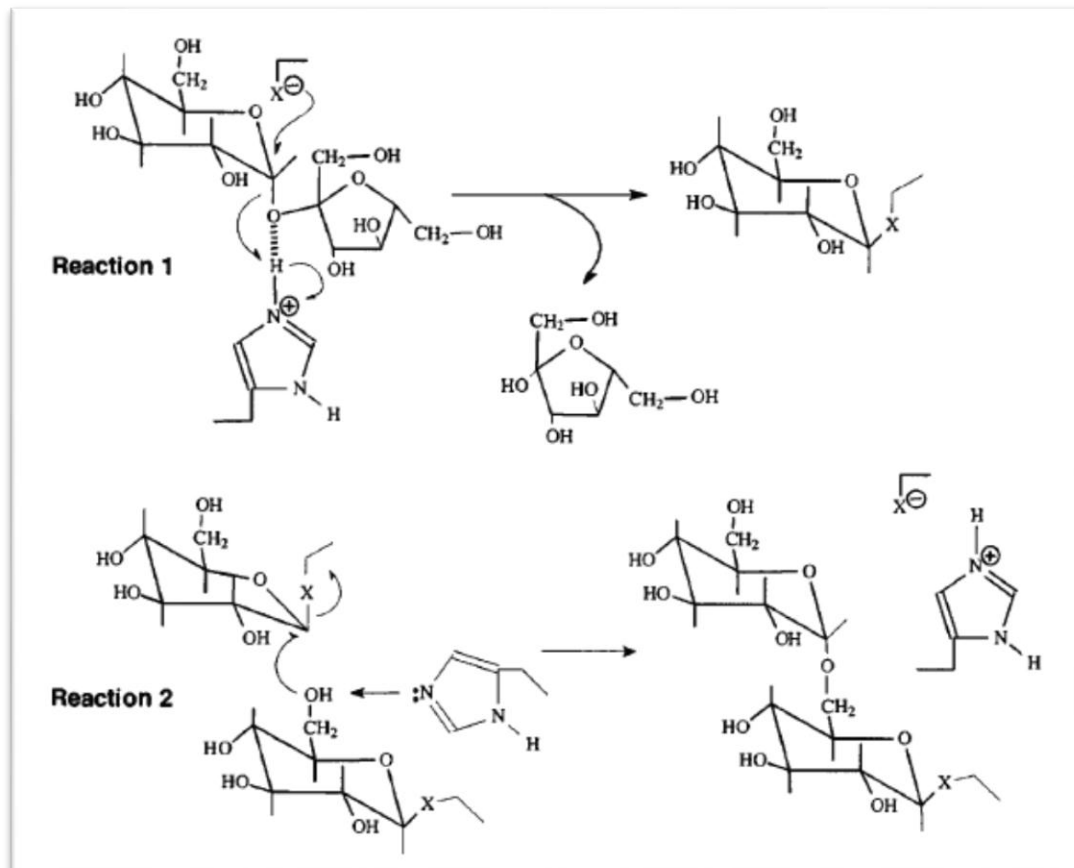
A formação da cadeia termina e a cadeia liberada pode ser acoplada a uma nova cadeia, como ramificação, por ação de “acceptor reaction” (ROBYT; EKLUND, 1982; ROBYT, 1985). Para que a reação ocorra, é necessário que haja transferência de um íon de hidrogênio para a frutose liberada da molécula de sacarose. Modificações químicas da dextranasacarase mostraram que dois grupos imidazóis de histidina são essenciais para a síntese da dextrana, pois eles doam seus íons hidrogênio para as unidades de frutose (Figura 18) e o grupo imidazol, em um segundo passo, se torna protonado novamente pela abstração do próton do ataque do grupo OH do C-6 do intermediário enzima-glicosídeo, facilitando o ataque nucleófilo e a formação da ligação α -(1,6) (ROBYT, 1996).

A introdução de outros açúcares, além da sacarose (como a maltose, por exemplo) na reação da dextranasacarase, induz a formação de oligossacarídeos ao invés de dextranas de alta massa molecular. O resíduo glicosídico proveniente da sacarose é desviado da síntese da dextrana e é transferido para um grupo hidroxílico dos açúcares chamados aceptores (ROBYT, WALSETH, 1978; EBERT, SCHENK, 1968). Muitos açúcares atuam como aceptores e vários autores os classificam de acordo com sua capacidade de desviar o resíduo glicosídico da dextrana para formar oligossacarídeos e seu efeito na velocidade da reação (FU, ROBYT, 1990; ROBYT, EKLUND, 1983; ROBYT, WALSETH, 1978; SU, ROBYT, 1993; PEREIRA, COSTA, RODRIGUES, MAUGERI, 1998).

Dentre todos os aceptores testados, maltose e isomaltose tem se mostrado ser mais efetivos (ROBYT; EKLUND, 1983; ROBYT; WALSETH, 1978). Por causa da sua alta eficiência e sua disponibilidade, a maltose tem sido o acceptor mais usado na síntese de oligossacarídeos pela dextranasacarase (DOLS et al., 1997, 1999; SMILEY et al., 1982). Alguns produtos de aceptores podem, por sua vez, serem usados como aceptores e uma série de produtos homólogos pode ser produzidos (Ebert, Schenk, 1968; Robyt, Walseth, 1978; Tsuchiya et al., 1955). Por

exemplo, uma série de 6² maltoses isomaltodextrinosídicas resultam quando a maltose é o aceptor (FU; ROBYT, 1990).

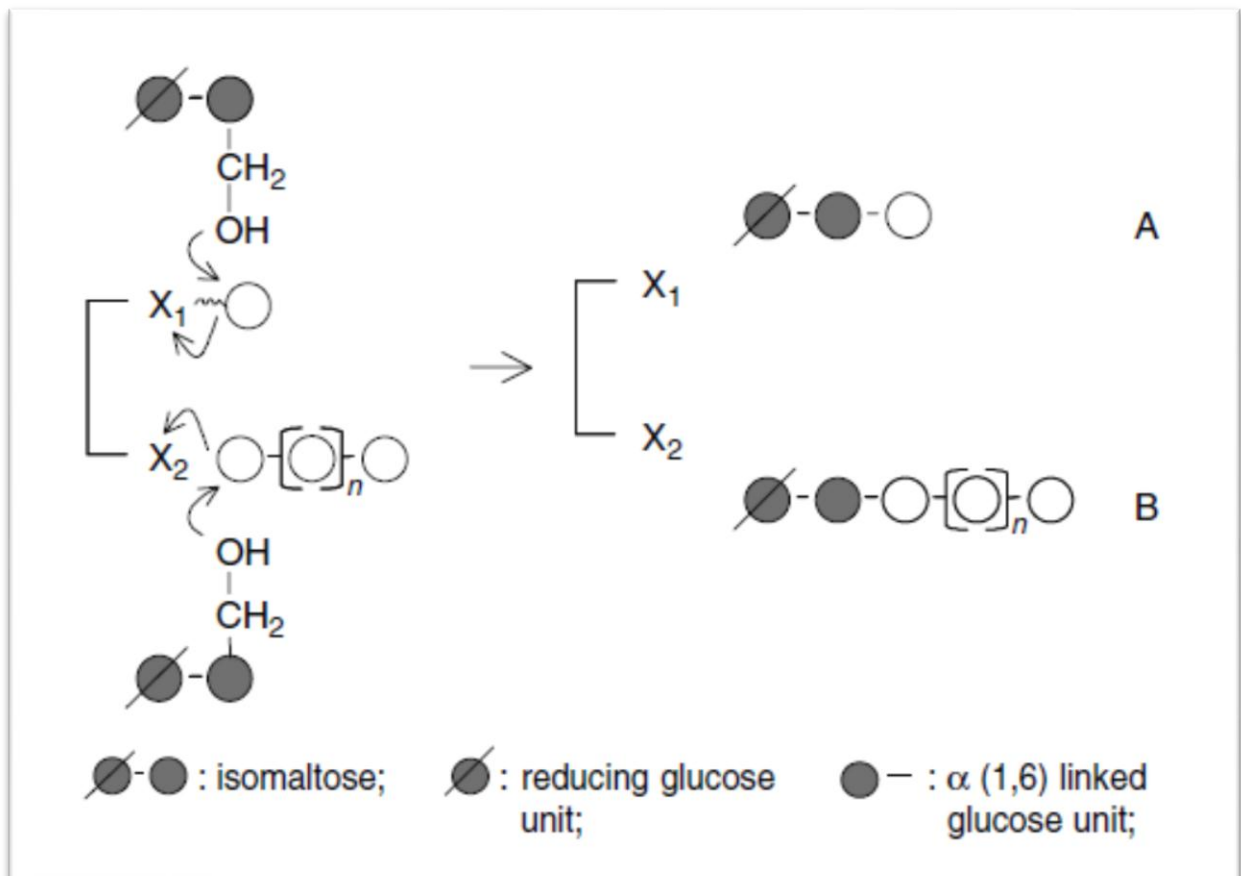
Figura 18. Mecanismo de clivagem da sacarose e formação da ligação glicosídica α -(1,6) pela ação da dextranasacarase. Reação 1: deslocamento do nucleófilo e protonação da metade frutose para formação do intermediário glicosil-enzima. Reação 2; formação da ligação glicosídica α -(1,6) pelo ataque do grupo hidroxílico C-6 no C-1 para formação do complexo glicosil-enzima; o ataque é facilitado pela abstração de um próton do grupo hidroxílico do imidazol



Fonte: Robyt, (1985).

Mecanismos estudados têm indicado que o aceptor interage com os intermediários enzima-glicosil ou enzima-dextranosil para liberar a glicose ou a cadeia de dextrana do sítio ativo da enzima, com a formação de ligação covalente entre a glicose ou a dextrana e o aceptor. Quando o aceptor desvia a dextrana do sítio ativo, a polimerização da cadeia da dextrana é terminada (Figura 19) (ROBYT; EKLUND, 1982; ROBYT; WALSETH, 1978).

Figura 19. Mecanismo de reação acceptor para a dextranasacarase B-512F. Um carboidrato, como a isomaltose, desvia a unidade glicosídica ligada ao sítio ativo da enzima para formar um trissacarídeo, isomaltotriose (A) e a unidade glucanosil forma o final redutor da glucana (B)



Fonte: Robyt; Taniguchi, (1976)

Muitos pesquisadores já estudaram a cinética do complexo acceptor para obter informações quantitativas do rendimento, composição e distribuição do oligossacarídeo formado (ROBYT, EKLUND, 1983; PAUL et al., 1984; ORIOL et al., 1987; SU; ROBYT, 1993; PEREIRA et al., 1998; MARGUERITE et al., 1999). Outros pesquisadores examinaram o uso de tais aceptores para produção direta de dextrana clínica, que é atualmente produzida por hidrólise ácida da dextrana nativa, seguida de fracionamento por solvente orgânico (PAUL et al., 1984; PAUL et al., 1986; ORIOL et al., 1987; KIM, DAY, 1994; PEREIRA et al., 1998).

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Reação de transglicosilação para produção de AA-2G

Vinte mL da dextranasacarase FT045B purificada foi adicionada a 80 mL da solução substrato composta de 1,25% de ácido ascórbico e 250 mM de sacarose, preparados em tampão piridina/acetato 20 mM (pH 5,2). O ar foi retirado por uma bomba de vácuo, por 20 minutos e a solução mantida por 24 h à 23°C sob vácuo, com agitação leve. Uma alíquota de 7 µL da solução foi aplicada à 15 mm a partir da base da placa de CCD (Polygram sel G/UV), com uso de micropipeta.

Os tamanhos das aplicações foram mantidos entre 2 e 3 mm pela adição de 1 µL por vez, secando nos intervalos com ar frio. A placa foi irrigada até o topo na temperatura entre 20 a 22°C usando 2-propanol/1-butanol/água 12:3:4 (v/v/v) em duas ascensões. Após a separação, o composto resultante ligado ao ácido ascórbico pode ser visualizado sob luz UV.

4.2.2 Caracterização da estrutura do composto AA-2G por Espectrometria de Massas

Para as análises de massas foram feitas 80 aplicações, em placas de CCD (Polygram sel G/UV), de 7µL da solução resultante da reação de transglicosilação, aplicados 1 µL por vez, com uso de micropipeta, secando nos intervalos com ar frio. A placa foi irrigada até o topo na temperatura de 20 a 22°C usando 2-propanol/1-butanol/água 12:3:4 (v/v/v) em duas ascensões (amostra A) em três ascensões (amostra B) e em quatro ascensões (amostra C). As bandas ou *spots* correspondentes à amostra foram raspadas da placa, após a visualização e marcação sob luz UV, reunidas em um único frasco. A extração do composto de interesse foi por 3 lavagens consecutivas com 800 µL de metanol, sob agitação, seguidas de secagem total do solvente à vácuo. A amostra seca foi solubilizada em 200µL de tampão acetato de amônia 10 mM, contendo acetonitrila 50% (v/v) (MALLINCKRODT) e filtrada em filtro para seringa Millex®-HV, com membrana de PVDF de 45 µm (MILLIPORE). Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização do tipo “electrospray” (ESI) e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas

“ion-trap” e “Time-of-Flight” (IT-TOF SHIMADZU). As análises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo. Durante todo o experimento o software LCMS solution (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. A temperatura do CDL e da interface foi mantida a 200o C, a voltagem na agulha a 4,5 kV e a voltagem no cone a 3,5 V. O fluxo de gás secante (Nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (Nitrogênio) de 1,5 L/h. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 1000, com resolução de aproximadamente 15000.

4.3 Resultados e Discussões

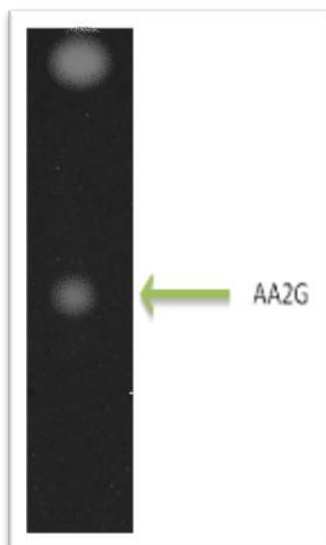
O composto ácido ascórbico 2- glicosídeo pode ser sintetizado com diversas enzimas tais como α -glicosidase (YAMAMOTO; MUTO; MURAKAMI; et al., 1990), ciclodextrina glicanotransferase (CGTase) (TANAKA; MUTO; YAMAMOTO, 1991) e sucrose fosforilase (KWON; KIM; LEE, 2007). A formação do AA-2G por uma glucanosucrase foi reportada somente em 2010, via produção catalisada pela glucanosucrase EG001 de *Leuconostoc lactis* EG001 (KIM et al., 2010).

A glicosilação usando glucanasucasres tem sido estudada no sentido de melhorar a função de vários compostos bioativos, como por exemplo, a produção de catequina glicosídeo (+)- por glicosiltransferase-D de *Streptococcus mutans* (MEULENBELD et al., 1999), a produção de salicina e fenólicos glicosídeos por glucanosucrase de *L. mesenteroides* (SEO et al., 2005), luteolina glicosídeo (BERTRAND et al., 2006), quercetina e arbutina glicosídeo (MOON et al., 2007).

As concentrações da enzima, AA e sacarose usadas na reação de transglicosilação neste presente trabalho foram baseadas no trabalho de Kim et al., (2010).

A Figura 20 mostra a placa de cromatografia em camada delgada após a eluição da amostra, sob luz UV para revelação dos compostos separados. A seta indica a presença do composto AA-2G.

Figura 20. Placa de CCD após eluição, o composto AA-2G está indicado com a seta.



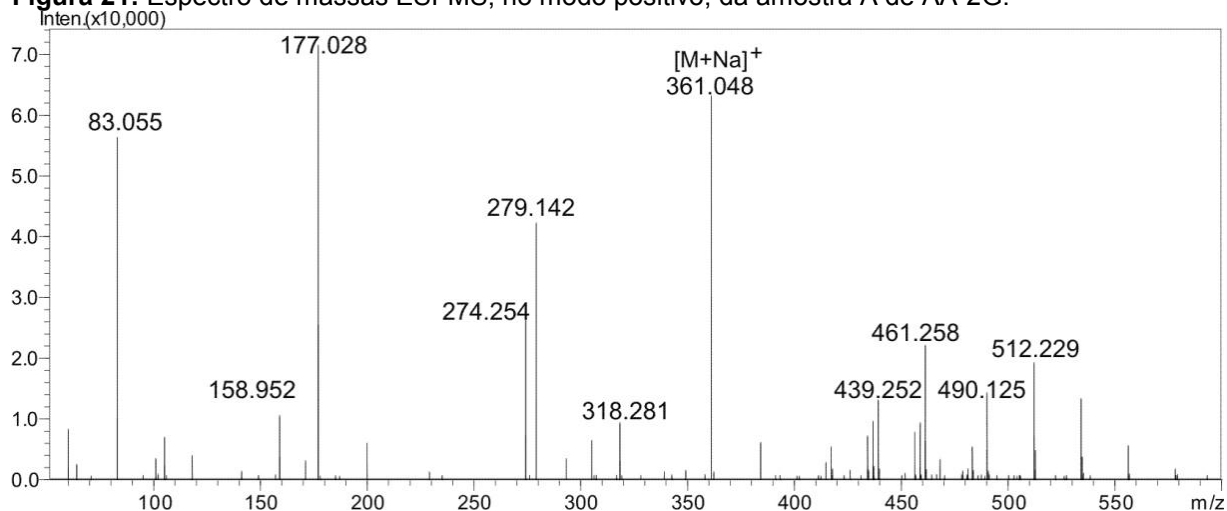
Fonte: Dados do próprio autor.

Esta primeira exposição da placa de CCD à luz UV, foi realizada apenas para a confirmação dos produtos reveláveis sob esta condição, ou seja, foi realizada para verificar se houve ou não a ligação do ácido ascórbico a unidades de glicose.

Com a confirmação da produção do composto de interesse pela exposição da placa de CCD à luz UV, seria necessária a obtenção de quantidade maior deste composto para que fosse realizada a identificação por espectrometria de massas. Para isto, foi necessária a aplicação de maior quantidade de amostra em placas de CCD para posterior extração do composto após a separação.

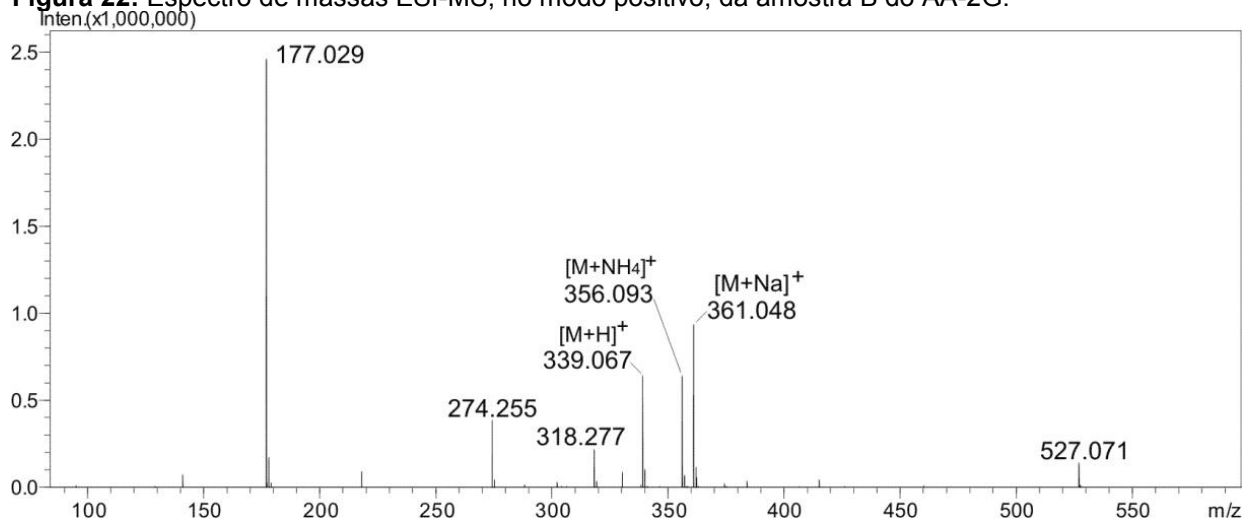
Para as análises de massas foram feitas 80 aplicações, em placas de cromatografia em camada delgada (Polygram sel G/UV), de 7 μ L da solução resultante da reação de transglicosilação, aplicados 1 μ L por vez, com uso de micropipeta, secando nos intervalos com ar frio. A placa foi irrigada até o topo de 20 a 22°C usando 2-propanol/1-butanol/água 12:3:4 (v/v/v) em duas ascensões (amostra A) em três ascensões (amostra B) e em quatro ascensões (amostra C). As bandas ou *spots* correspondentes à amostra foram retiradas da placa, após a visualização e marcação sob luz UV, reunidas em um único frasco. A extração do composto de interesse foi por 3 lavagens consecutivas com 800 μ L de metanol, sob agitação, seguidas de secagem total do solvente à vácuo.

O espectro representado na Figura 21 mostra os picos de m/z obtidos para a amostra A de AA-2G, onde são observados vários picos não correspondentes à amostra em questão. Observa-se que esta amostra possui vários componentes além do AA-2G, cujos picos correspondentes são os de m/z 177,028 (pertencente ao resíduo de glicose) e o pico de m/z 361,048, que corresponde ao AA-2G contendo um átomo de sódio ($[M+Na]^+$). Os demais picos, que não se referem ao AA-2G aparecem devido à amostra ter sido separada por CCD em apenas 2 ascensões, o que não possibilitou uma separação eficiente dos compostos presentes na reação.

Figura 21: Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, da amostra A de AA-2G.

Fonte: Dados do próprio autor.

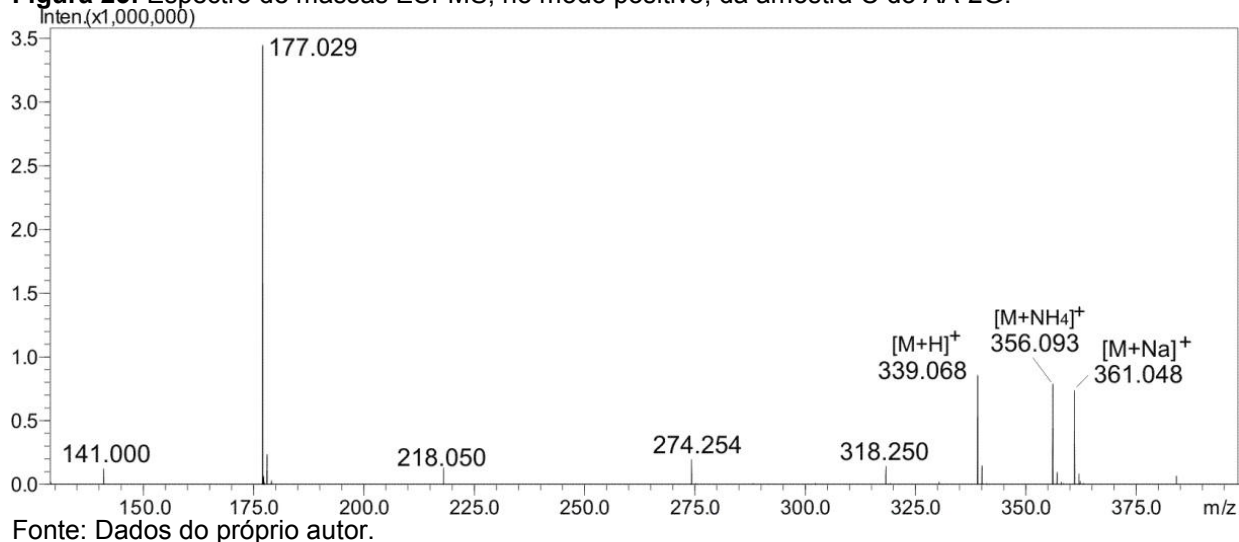
No espectro de massas da amostra B de AA-2G (Figura 22) é possível observar a presença do pico de m/z 177,029, correspondente ao íon do resíduo de glicose na forma $[M+H]^+$. Os outros íons formados de m/z 339,093, 356,093 e 361,048 correspondem aos íons do AA-2G nas formas $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ e $[M+Na]^+$, respectivamente. É possível observar ainda a presença de outros íons como o de m/z 527,071, que correspondem a outros componentes não identificados presentes na banda extraída, devido a esta amostra ter sofrido apenas 3 ascensões em solventes na placa de CCD, o que impossibilitou a completa separação dos componentes da reação.

Figura 22: Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, da amostra B do AA-2G.

Fonte: Dados do próprio autor.

O espectro de massas da amostra C do AA-2G está representado na Figura 23, onde é possível observar os picos de m/z 177,029, correspondente ao íon do resíduo de glicose, na forma $[M+H]^+$, e os íons referentes à molécula do AA-2G-C nas formas monoprotônica (m/z 339.067; $[M+H]^+$), contendo um NH_4^+ (m/z 356,093; $[M+NH_4]^+$) e contendo sódio (m/z 361,048; $[M+Na]^+$).

Figura 23: Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, da amostra C do AA-2G.



Apesar de não ter sido utilizado um padrão do AA-2G para verificar os picos característicos do composto obtidos pela espectrometria de massas, é possível fazer esta comparação utilizando resultados já obtidos em artigos de produção do AA-2G, por via enzimática, como por exemplo, a transglicosilação do ácido ascórbico a ácido ascórbico 2-glicosídeo pela sacase-fosforilase recombinante de *Bifidobacterium longum* (KWON; KIM; LEE, 2007) onde após análise do composto produzido e do AA-2G padrão por LC-MS/MS, o espectro obtido mostrou pico em 339 m/z da molécula protonada ($[M+H]^+$), além do íon molecular em 177 m/z .

Zhang et al., (2011b) também relataram a caracterização do AA-2G por espectrofotometria de massas, contudo após transformação enzimática do 2-O- α -D-glucopiranosil-L-ascorbic acid usando α -ciclodextrin glucanotransferase de *E. coli* recombinante. A análise por LC-MS/MS do composto padrão revelou a molécula protonada $[M+H]^+$ em 339 m/z , e seus íons moleculares em 177, 141 e 95 m/z .

4.4 Conclusão

Pela comparação com os resultados obtidos em outros artigos que também caracterizaram o composto AA-2G, pode-se concluir que a dextranasacarase sob as condições de reação de transglicosilação descritas neste estudo, foi capaz de produzir o composto AA-2G.

5. OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA

A dextrana produzida com massa molar média controlada apresenta uma gama de aplicações na área alimentícia, farmacêutica e o uso de derivados de dextrana. O método usual para a preparação de dextrana clínica de baixa massa molar média é relativamente ineficiente, uma vez que grande parte da dextrana é quebrada em isomaltodextrinas. É objetivo de vários estudos buscar estratégias para se obter dextrana com massa molar controlada por um processo mais eficaz. O controle das variáveis de produção tem se mostrado o método com maior potencial, apesar da não existência de muitos estudos sobre este tema ainda.

O objetivo deste estudo é entender quais as condições reacionais necessárias para o controle do Número Médio da Massa Molecular da dextrana, para direcionamento do seu uso. Conhecer as condições favoráveis para conduzir esta produção, eliminando gastos com processos posteriores de quebra da estrutura do polímero, é fato bastante importante que agrega valor ao produto, empregando inicialmente um planejamento experimental com delineamento composto central rotacional (DCCR), com três variáveis independentes: temperatura, concentração de sacarose e atividade enzimática, contudo foram feitas algumas alterações no planejamento experimental, pois a enzima dextranasacarase FT045B não apresentou alta concentração suficiente para o planejamento proposto, além de já existir um estudo feito com estas variáveis, embora com outra linhagem de *L. mesenteroides* (FALCONER; MUKERJEA; ROBYT, 2011).

Um teste para determinar quais variáveis causariam modificações significativas no número médio de massa molecular da dextrana produzida foi realizado. Para isto foram testadas 4 possíveis variáveis. As duas variáveis que apresentaram melhores resultados foram testadas em um planejamento fatorial completo com 9 experimentos para verificar qual seria a faixa de estudo que causaria maior impacto na diminuição no número médio de massa molecular da dextrana produzida. Em posse das faixas de valores para as variáveis, foi então

delineado um planejamento experimental composto central para a obtenção do ponto ótimo de produção de dextrana clínica.

5.1 Revisão bibliográfica

5.1.1 Dextrana: estrutura

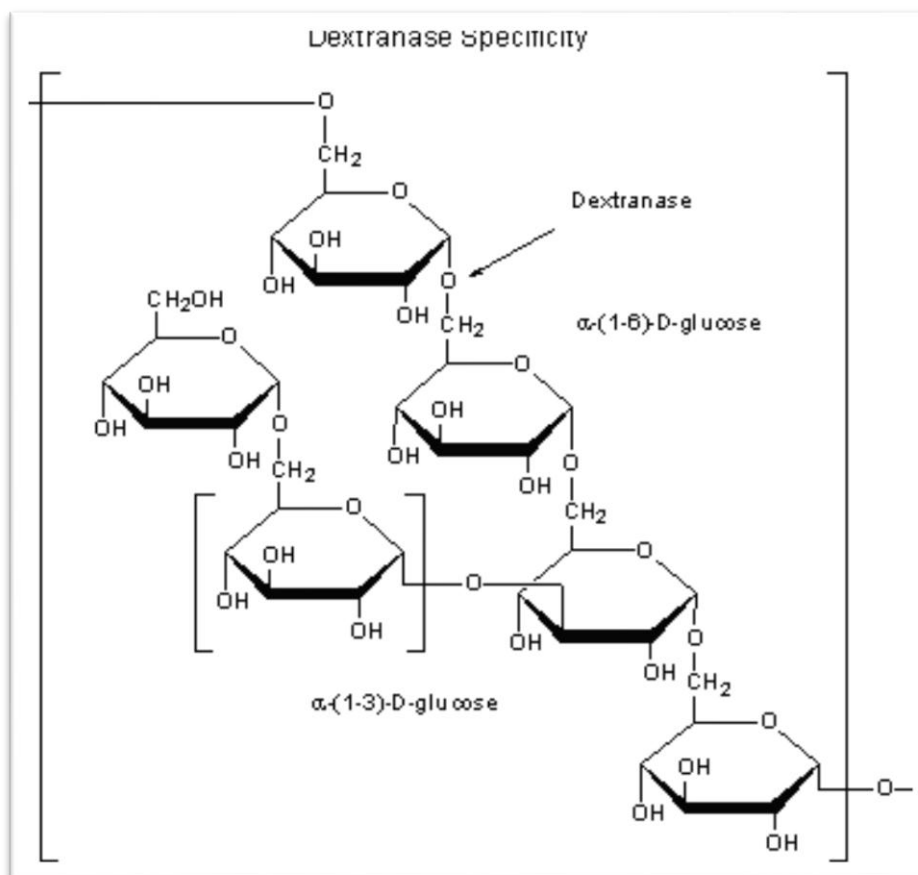
A dextrana é um homopolissacarídeo bacteriano extracelular (SIDEBOTHAN, 1974; MONSAN et al., 2001), cuja cadeia principal é composta de ligações α -(1,6) de resíduos de glicose, com ramificações iniciadas por ligações α -(1,3), mas continuadas por ligações α -(1,6) igualmente à cadeia principal (SEYMOUR; KNAPP, 1980; DOLS et al., 1998; BUCHHOLZ; MONSAN, 2001; NAESSENS et al., 2005).

Algumas dextranas apresentam ramificações ligadas à cadeia principal por ligações α -(1,2) ou α -(1,4), dependendo da fonte bacteriológica. A exata estrutura de cada tipo de dextrana depende do grau de ramificação com ligações α -(1,2), α -(1,2) e α -(1,4) (SEYMOUR; KNAPP, 1980), que por sua vez depende linhagem bacteriana produtora e, portanto da especificidade da dextranasacarase EC.2.4.1.5 envolvida (JEANES et al., 1954). A Figura 24 ilustra bem esta descrição.

A dextrana pode ser produzida pelo crescimento de várias linhagens bacterianas de *Leuconostoc mesenteroides* e várias espécies de *Streptococcus* em meio de cultura que contenha sacarose (KIM, D et al., 2003). A produção de dextrana é influenciada por um número de fatores: propriedades físico-químicas (JEANES, 1965), tais como solubilidade, viscosidade, rotação ótica específica e teor de nitrogênio, fósforo e presença de cinzas no meio, além de depender também dos micro-organismos presentes (JEANES et al., 1954).

Uma mesma enzima pode catalisar a síntese de vários tipos de ligações na dextrana, permitindo desta forma a construção de um polímero ramificado (NEELY, NOTT, 1962; SMITH, SAHNLEY, GOODMAN, 1994). Algumas linhagens bacterianas são capazes de produzir diferentes dextranasacarases, construindo desta forma, dextranas de diferentes estruturas (FIGURES, EDWARDS, 1981; CÔTÈ, ROBYT, 1982; ZAHLEY, SMITH, 1995).

Figura 24. Estrutura da dextrana com sua cadeia principal formada por ligações α -(1,6) de resíduos de glicose, com ramificações α -(1,3).



Fonte: www.sigmaaldrich.com.br

A dextrana sintetizada pela enzima dextranasacarase FT045B é composta de resíduos de D-glicose, contendo 97,9% de ligações α -(1,6) na cadeia principal e 2,1% de ramificações α -(1,3), ao passo que a dextrana comercial B-512F apresenta 95% de ligações α -(1,6) na cadeia principal e 5% de ramificações α -(1,3) (VETTORI; FRANCHETTI; CONTIERO, 2012).

5.1.2 Métodos para determinação dos tamanhos moleculares das dextranas.

Existem dois métodos utilizados para a determinação da massa molecular dos polissacarídeos, o método do número médio da massa molar e o método da massa molar média. O número médio da massa molar (MW_n) foi

escolhido para a determinação do tamanho das dextranas deste estudo porque o método da massa molar média é destinado a moléculas maiores e mais pesadas (MARTIN, 1964), e gera um resultado alto e impreciso (FALCONER; MUKERJEA; ROBYT, 2011).

Macromoléculas como os polissacarídeos, que têm afinidade de associarem-se com hidrogênios intermoleculares e/ou ligações hidrofóbicas, também contribuem para gerar um resultado falso, de massa molecular mais alta para a mesma amostra. Uma comparação das massas moleculares médias determinadas pelos produtores de dextranas comerciais e os números médios das massas moleculares determinadas (FALCONER; MUKERJEA; ROBYT, 2011) mostraram que a MWw é cerca de duas vezes a massa do MWn. O método do número médio da massa molecular é determinado pela análise química do grupo terminal. Os grupos redutores finais são determinados pelo método micro do bicincroninato de cobre (FOX; ROBYT, 1991) e a massa total de amostras de dextranas foram determinadas pelo método micro ácido sulfúrico-fenol (FOX; ROBYT, 1991).

5.1.3 Produção de Dextrana com massa molar controlada

A dextrana comercial, de várias massas molares médias, tem sido produzida desde 5.000 Da até 500.000 Da. A dextrana de massa molar média baixa (dextrana clínica, MWn = 26.500 Da até 39.000 Da) tem sido utilizada como expensor do plasma sanguíneo. Dextranas de massa molar ainda mais baixas (dextrana clínica, MWn = 6.000 Da até 8.000 Da) tem sido empregadas na formação de complexos com ferro para o tratamento da anemia. Dextranas de alta massa molar (MWn= $\sim 1-2 \times 10^6$ Da) foram aprovadas pela União Europeia como ingrediente alimentício em produtos de panificação.

Dextranas de massa molares relativamente altas têm sofrido ligações cruzadas para variar suas extensões e gerar diferentes materiais de cromatografia (produtos Sephadex), que têm sido usados como gel para filtração por mais de 50 anos. Dextranas de baixa massa molar ligadas ao sulfato têm sido usadas como substituto da heparina como anticoagulante sanguíneo.

Com o desenvolvimento de novas estratégias para a produção de dextrana de várias massas diferentes, um leque de aplicações também tem surgido na área alimentícia, farmacêutica, sendo que o uso de derivados de dextrana tem se mostrado cada vez mais visados (NAESSENS et al., 2005).

O método usual para a preparação de dextrana clínica de baixa massa molar é a hidrólise ácida em temperaturas elevadas, seguida de fracionamento da dextrana de baixa massa molar para separar as isomaltodextrinas formadas. Este método gera dextranas de vários tamanhos devido à natureza rústica do método, além de ser relativamente ineficiente, uma vez que grande parte da dextrana é quebrada em isomaltodextrinas (WOLFF et al., 1954; ZIEF; BRUNNER; METZENDORF, 1956).

Uma alternativa para o controle da produção de dextranas com massas molares controladas foi desenvolvida em 1992 usando a fermentação combinada de dois organismos, *L. mesenteroides* que produz a dextranasacarase e uma linhagem de *Lipomyces starkeyi*, uma levedura que produz dextranase (DAY; KIM, 1992). Uma adaptação deste processo de produção seletiva de dextrana é a digestão da dextrana com dextranase (GOULAS et al., 2004). Outra modificação do método seria o uso de uma única enzima que expressasse as duas atividades (KIM et al., 2009). Devido à hidrólise da dextrana pela dextranase também produzir isomaltodextrinas, que podem atuar como aceptores e gerarem dextranas de altas massas molares, o rendimento do processo se torna menor, uma vez que seria necessário fazer uma separação contínua da isomaltodextrina produzida.

Além da síntese da dextrana, a enzima dextranasacarase também catalisa reações de transglicosilação, comumente chamadas de “acceptor reactions”, quando outros carboidratos estão presentes na reação (TSUCHIYA et al., 1955; KOEPSSELL et al., 1952; ROBYT; WALSETH, 1978; ROBYT; EKLUND, 1983), ou quando a própria cadeia de dextrana éceptor. As “acceptor reactions” são reações secundárias, mas tem se mostrado competidoras com a síntese de dextrana e até inibitórias desta síntese no caso de altas concentrações de aceptores presentes no meio reacional (Robyt, Eklund, 1983; Su, Robyt, 1993).

Um processo foi proposto para a obtenção de dextrana com massa molecular controlada, usando aceptores (GÓMES DE SEGURA et al., 2004; MOULIS et al., 2008; PAUL et al., 1986) no processo de síntese. A reação de transglicosilação com os aceptores tais como glicose, maltose ou isomaltose, compete com a reação de polimerização gerando dextranas de baixa massa molecular inibindo a síntese de dextrana, e dando baixa quantidade dextrana produzida (ROBYT; EKLUND, 1983; SU; ROBYT, 1993). Comparando este método com o método do uso da dextranase, este gera dextranas com menor massa molar, mas com perda de rendimento de dextrana, devido à inibição da síntese da mesma e da formação de aceptores de isomaltodextrinas com baixa massa molar que competem com a síntese de dextrana e deve ser removida da dextrana produzida.

Roby, Yoon, e Mukerjea, (2008), mostraram que usando uma concentração constante de sacarose (20 mM) e variando a concentração de enzima (10, 1,0 U/mL e 0,1 U/mL), número médio da massa molecular (MWn) da dextrana produzida muda radicalmente, sendo inversamente proporcional à concentração enzimática.

Falconer, Mukerjea, e Robyt, (2011), estudaram o efeito do emprego de quatro concentrações de enzima (50, 10, 1,0 e 0,1 U/mL), cinco concentrações de sacarose (20, 50, 100, 200 e 1000 mM), e duas temperaturas (20°C e 30°C). Determinaram o número médio da massa molecular (MWn) de 33 dextranas produzidas na faixa de 20.630 Da até 728.310 Da à 20°C e 63.970 Da até 1.645.700 Da à 30°C. Eles observaram que o número médio da massa molecular (MWn) das dextranas eram mais baixos quando as concentrações de dextranasacarase eram mais altas, indicando que o número médio da massa molecular das dextranas produzidas era inversamente proporcional à concentração enzimática. Descobriram também que o número médio da massa molecular das dextranas sintetizadas era proporcional à concentração de sacarose e quando a quantidade de enzima e sacarose eram constantes, o número médio da massa molecular da dextrana produzida aumentava com o aumento da temperatura de 20°C para 30°C.

Kim et al., (2003), descobriu que a dextranasacarase B-512FMC sintetizava dextrana com vários números médios da massa molecular e graus de

ramificação que eram dependentes da concentração de sacarose, pH e temperatura. Robyt et al., em 2008, também descobriu, usando um substrato, a sacarose a 20 mM, que o número médio da massa molecular da dextrana sintetizada pela dextranasacarase B-512FMC era inversamente proporcional à concentração (10 U/mL, 1,0 U/mL e 0,1 U/mL) de dextranasacarase, devido ao alto grau de processividade da polimerização da dextrana pela enzima.

A relação inversa do número médio da massa molecular da dextrana sintetizada com o aumento da concentração de dextranasacarase é devido à processividade natural da polimerização da dextrana pela dextranasacarase B-512FMC (ROBYT; YOON; MUKERJEA, 2008). A processividade ocorre quando D-glicose da sacarose na reação enzimática é continuamente adicionada à cadeia de dextrana que está covalentemente ligada ao sítio ativo da enzima (ROBYT; YOON; MUKERJEA, 2008).

Assim que a concentração enzimática decresce, existem poucas moléculas de enzimas na solução e como consequência poucos sítios ativos estão ligados às cadeias de dextrana em crescimento. Com a mesma quantidade de sacarose presente na reação, as cadeias são ligadas ao baixo número de sítios ativos disponíveis, sintetizando desta forma, cadeias longas com alto o número médio da massa molecular (FALCONER; MUKERJEA; ROBYT, 2011).

A massa molar média da dextrana sintetizada também aumenta com o aumento da concentração de sacarose, indicando que o número médio da massa molecular das dextranas sintetizadas é diretamente proporcional à concentração de sacarose. Isto é primeiramente devido à cinética de Michaelis-menten na qual a velocidade reacional é proporcional à concentração de substrato, gerando moléculas mais longas (FALCONER; MUKERJEA; ROBYT, 2011).

O número médio da massa molecular das dextranas produzidas também aumenta com o aumento da temperatura de 20 para 30°C (FALCONER; MUKERJEA; ROBYT, 2011). Isto é devido aos seguintes fatores: (1) a velocidade da reação de polimerização aumenta com o aumento da temperatura; (2) cadeias lineares de dextrana são liberadas do sítio ativo da enzima pela hidrólise da ligação covalente da dextrana com o sítio ativo, e com o aumento da temperatura a

velocidade de hidrólise também aumenta (ROBYT; 1995; ROBYT; TANIGUCHI, 1976); (3) as cadeias de dextranas liberadas se tornam aceptores, e a velocidade com que estas cadeias aceptoras se ligam ao sítio ativo da enzima é dependente da difusão das cadeias em solução da cadeia na solução, o que depende da temperatura. O aumento da temperatura aumenta o grau de ramificação da dextrana e, portanto aumenta o número médio da massa molecular (ROBYT; TANIGUCHI, 1976).

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Uso do planejamento experimental composto central para o estudo da produção de dextrana de massa molar controlada

Como mencionado anteriormente, seria necessário, devido à baixa atividade da enzima obtida durante o processo de purificação, desenvolver outras variáveis que fossem capazes de causar variações no número médio da massa molecular da dextrana formada. Inicialmente foram testados 4 variáveis potenciais na síntese da dextrana: uso de Tween 80, aplicação de Agitação, Ultrassom e Repouso.

Diante dos resultados obtidos neste experimento, um planejamento experimental fatorial completo, com as duas variáveis que modificavam o valor da resposta (número médio da massa molecular da dextrana) foi delineado para se determinar as faixas de valores dos fatores que proporcionariam diminuição número médio da massa molecular da dextrana.

O experimento resultante foi composto de 2 fatores (porcentagem de Tween 80 e Agitação da reação de produção de dextrana) relacionados entre si em 9 experimentos, conforme tabela 5.

Tabela 5: Planejamento fatorial completo, com 2 fatores (concentração de Tween 80 e aplicação de agitação) e 9 experimentos.

EXP.	Tween 80 (%)	Agitação (rpm)
A	1	0
B	1	100
C	1	200
D	5	0
E	5	100
F	5	200
G	10	0
H	10	100
I	10	200

Fonte: Dados do próprio autor.

Após a realização dos experimentos do planejamento fatorial completo, o que possibilitou a obtenção das faixas de valores a serem utilizadas, foi realizado um planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com

quatro ensaios nos níveis +1 e -1, quatro ensaios nos níveis dos pontos axiais (-1,414 e +1,414) e mais uma triplicata no ponto central (0), totalizando 11 ensaios, realizados em sequência aleatória.

Os níveis das variáveis independentes que foram estudadas apresentam-se na forma codificada (adimensionalizada) e em valores reais, na matriz de planejamento, conforme Tabela 6.

Tabela 6.: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional para produção de dextrana clínica.
Fonte: Dados do próprio autor.

EXP.	Valores codificados		Valores reais	
	Agitação (rpm)	Tween 80 (%)	Agitação (rpm)	Tween 80 (%)
A	0	0	500	4
B	1	1	700	6
C	-1	1	300	6
D	1	-1	700	2
E	0	-1,41	500	1,17
F	-1	-1	300	2
G	-1,41	0	217	4
H	1,41	0	783	4
I	0	1,41	500	6,83
J	0	0	500	4
K	0	0	500	4

Fonte: Dados do próprio autor.

Vale ressaltar que o programa Statistic 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK), foi utilizado para formação das matrizes planejamento e para as análises de regressão múltipla de todos os dados obtidos experimentalmente, além disso, as superfícies de resposta e superfícies de contorno foram geradas para entender as interações entre as diferentes variáveis. O modelo gerado foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) e os pontos ótimos calculados a partir do programa Maple 9.5 (Waterloo Maple Inc., Waterloo, Ontário, Canadá).

5.2.2 Reação enzimática para produção de dextrana

A reação enzimática foi preparada pela adição de 100uL de solução tampão (piridina/acetato 300 mM, pH 5,2) à 500 uL de solução sacarose 600 mM, volume necessário de Tween 80 correspondente à % (v/v) requerida em cada experimento e aquecimento à por 10 minutos à 30°C em banho-maria. A reação enzimática teve início pela adição de 900 uL de enzima dextranasacarase FT045B

com atividade total de 2U, sendo que a solução foi disposta em agitador térmico (Banho seco digital da Dryblock) por 2 períodos de conversão ou 33,34 horas (1,38 dias).

No final do tempo reacional, 3,0 mL de etanol gelado foram adicionados à reação para precipitar a dextrana produzida, sendo posteriormente mantida à 4 °C por 24 horas para completa precipitação. A dextrana precipitada foi centrifugada a 13000 g por 30 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado dissolvido em 1,5 mL de água, com auxílio de aquecimento (Max 80°C) e agitação (Vórtex).

Após completa solubilização da dextrana em água, a solução foi resfriada em gelo por 10 minutos para novamente ser precipitada com 3 mL de etanol gelado. A solubilização e a precipitação foram repetidas mais uma vez para garantir que não haja frutose nem sacarose presentes. A dextrana foi tratada de cinco a sete vezes com acetona e uma vez com etanol anidro e seca em forno a 40 °C por 48 horas sob vácuo.

5.2.3 Determinação da massa molar média

A massa molar média (DP_n) (JANE; ROBYT, 1984) da dextrana foi determinada pela medição do valor de redução usando o método bicincroninato de cobre e a quantificação dos carboidratos pelo método fenol-ácido sulfúrico (FOX; ROBYT, 1991). Grau de polimerização = DP_n = [(carboidratos totais em µg de D-glicose)÷(valor redutor em µg de maltose)] x 1.9; massa molar média = M_n = [(DP_n) x 162] + 18.

5.3 Resultados e Discussões

Inicialmente foram testados 4 variáveis: uso de Tween 80, Agitação, Ultrassom e Repouso. Os resultados dos números médios das massas moleculares das dextranas obtidas estão dispostos na tabela 7.

Tabela 7. Condições empregadas para a reação de produção de dextrana para verificação dos possíveis fatores

CONDIÇÕES	MWn (Da)
20% Tween 80	57
150 rpm de Agitação	56
Repouso	67
Uso de Ultrassom a cada 30 min. por 5 min.	66

Fonte: Dados do próprio autor.

Como o objetivo deste experimento é diminuir o MWn da dextrana formada por reação enzimática, as variáveis escolhidas para serem empregadas no planejamento fatorial completo foram o uso de Tween 80 no meio racional e a agitação da solução durante a síntese da dextrana, que foram trabalhadas nas faixas de 1 a 10%(v/v) e de 0 a 200 rpm respectivamente.

Os resultados do planejamento fatorial completo para determinação das faixas de valores para as duas variáveis indutoras de produção de dextrana de baixo número de massa molecular estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Números médios de massas moleculares das dextranas obtidas em planejamento experimental fatorial completo com duas variáveis (Tween 80, variando de 1 a 10% em solução; e aplicação de Agitação da solução reacional durante a síntese da dextrana, variando entre 0 e 200 rpm).

EXP.	Tween 80 (%)	Agitação (rpm)	MWn (Da)
A	1	0	86
B	1	100	88
C	1	200	75
D	5	0	76
E	5	100	88
F	5	200	67
G	10	0	95
H	10	100	96
I	10	200	89

Fonte: Dados do próprio autor.

Os resultados obtidos foram analisados por regressão múltipla, utilizando o programa Statistica 7.1 e considerando como fatores os termos isolados

e os quadráticos das variáveis estudadas, por se tratar de um Planejamento Fatorial Completo.

A determinação dos parâmetros significativos foi feita pelo teste de hipótese utilizando *t* de Student com nível de significância de 5%, sendo desconsiderados os parâmetros que apresentam nível de significância maior que este valor. O coeficiente de correlação ao quadrado R^2 também foi utilizado para todas as respostas, a fim de constatar a significância ou não do modelo ajustado.

A Tabela 9 apresenta a ANOVA, coeficientes de determinação (R^2) e os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudadas como resposta ao MWn da dextrana.

Tabela 9. ANOVA do modelo quadrático do número médio de massa molecular da Dextrana obtida nos experimentos do Planejamento Fatorial Completo.

	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calculado}	p
Tween (%) L+Q	413,3724	2	206,6862	13,907	0,0158
Agitação (rpm) L+Q	299,8023	2	149,9012	10,086	0,0274
Erro	59,4482	4	14,862		
SS total	772,6229	8			

L=linear; Q=Quadrático; p=intervalo de confiança.

Fonte: Dados do próprio autor.

Através da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 9, foi possível observar que o modelo mostrou boa concordância com os dados experimentais obtidos, os modelos quadráticos são válidos no intervalo de 95% de confiança, tendo em vista que o $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} para todas as variáveis, o que torna esses modelos passíveis de serem usados para estimar valores para a resposta quanto ao número médio da massa molecular da Dextrana produzida, a partir da superfície de resposta.

É possível afirmar que a agitação e a presença de Tween 80 na reação enzimática de produção de dextrana apresentaram efeito significativo sobre o Número Médio de Massa Molecular da Dextrana produzida, para um nível de 5% de significância.

Dessa forma, gerou-se um modelo quadrático (equação matemática) para a variável resposta, representados pela Equação 1, com coeficiente de

regressão de 84,611%, mostrando que mais de 84% da variação do Número Médio da Massa Molecular da Dextrana produzida (Da) é explicada pelo modelo apresentado.

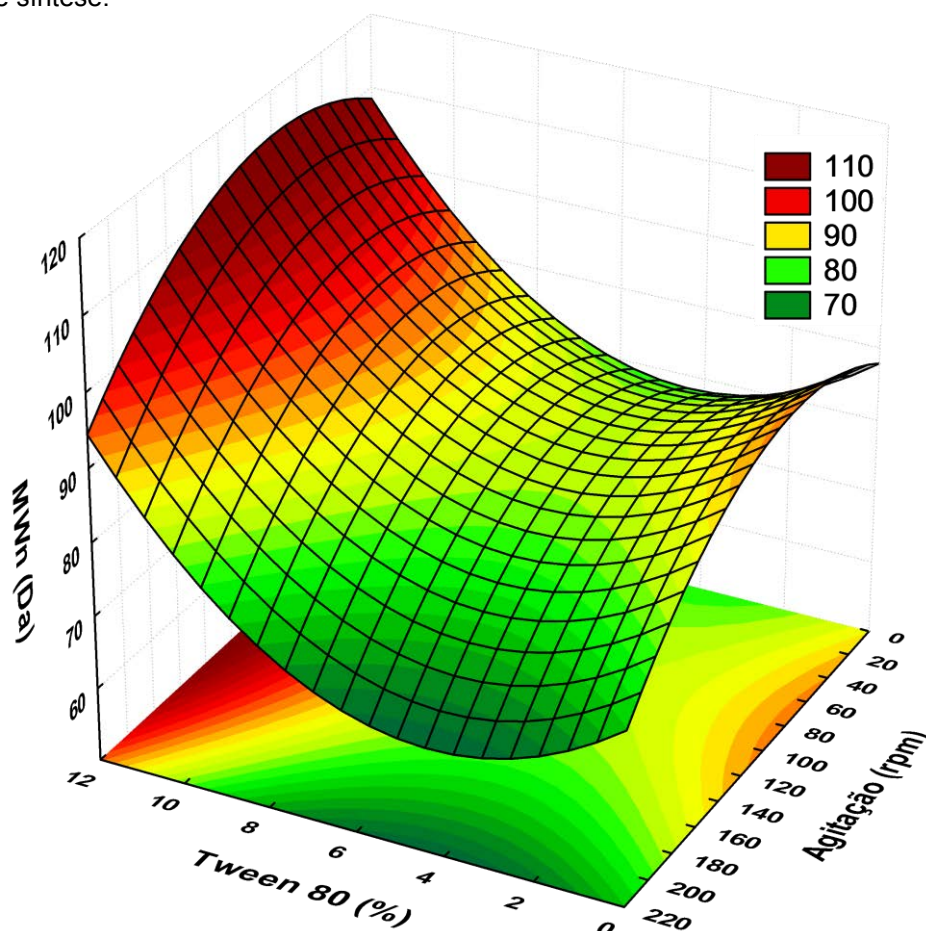
$$\text{MWn (Da)} = 84,56594 + 5,41118\text{Tw} - 5,15015\text{Tw}^2 - 4,47230^a + 4,74070A^2$$

Equação 1

Onde A = agitação (rpm) e Tw = concentração de Tween 80 (%).

A Figura 25 representa a superfície de resposta obtida para o número médio de massa molecular (MWn) da produção de dextrana sob influência de agitação e presença de Tween 80.

Figura 25. Superfície de resposta para o MWn da dextrana produzida em experimentos de planejamento fatorial completo, sob influência de concentrações de Tween 80 e agitação durante o processo de síntese.



Fonte: Dados do próprio autor

É possível, após análise da superfície de resposta, identificar a faixa de valores da concentração de Tween 80 e da agitação que causaram diminuição no número médio da massa molecular da dextrana produzida nos experimentos. O

Delineamento Composto Central, foi planejado de 2 a 6,83% de Tween 80 e de 217 a 783 rpm de agitação.

A matriz do planejamento, gerada pela aplicação do delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com as respectivas variáveis resposta, onde cada linha da matriz representa uma corrida experimental ou ensaio, está representada pela Tabela 10.

Tabela 10. Matriz do planejamento (DCCR) com os fatores (codificados e reais) e resultados do número médio da massa molecular da Dextrana (Da).

EXP.	Valores codificados		Valores reais		Resposta
	Agitação (rpm)	Tween 80 (%)	Agitação (rpm)	Tween 80 (%)	MWn (Da)
A	0	0	500	4	55,68
B	1	1	700	6	79,79
C	-1	1	300	6	111,27
D	1	-1	700	2	87,09
E	0	-1,41	500	1,17	113,19
F	-1	-1	300	2	126,77
G	-1,41	0	217	4	120,02
H	1,41	0	783	4	82,24
I	0	1,41	500	6,83	90,42
J	0	0	500	4	56,77
K	0	0	500	4	57,68

Fonte: Dados do próprio autor

Após da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 11, observou-se que o modelo mostrou boa concordância com os dados experimentais obtidos.

Tabela 11. ANOVA do modelo quadrático do número médio de massa molecular da Dextrana obtida após análise dos resultados dos experimentos do delineamento composto central rotacional.

	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}	p
Agitação (rpm) L	1940,035	1	1940,035	184,8489	0,000039
Agitação (rpm) Q	2771,237	1	2771,237	264,0468	0,000016
Tween 80 (%) L	378,122	1	378,122	36,0279	0,001843
Tween 80 (%) Q	2856,028	1	2856,028	272,1259	0,000015
Tween x Agitação	16,766	1	16,766	1,5975	0,261977
Erro	52,476	5	10,495		
SS total	6735,946	10			

L=linear; Q=Quadrático; p=intervalo de confiança.

Fonte:Dados do próprio autor

Verificou-se que os modelos quadráticos são válidos no intervalo de 95% de confiança, tendo em vista que o $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} , o que torna esses modelos passíveis de serem usados para estimar valores para a resposta quanto

Número médio da Massa Molecular da Dextrana produzida, a partir da superfície de resposta.

É possível afirmar que a agitação e a presença de Tween 80 na reação enzimática de produção de dextrana apresentaram efeito significativo sobre o Número Médio da Massa Molecular da Dextrana produzida, enquanto a interação destas duas variáveis não teve efeito significativo, para um nível de 5% de significância.

Um modelo quadrático (equação matemática) para as variáveis resposta foi gerado e está representado pela Equação 2, com coeficiente de regressão de 98,44%, mostrando que mais de 98% da variação do Número Médio de Massa Molecular da Dextrana (Da) é explicada pelo modelo apresentado.

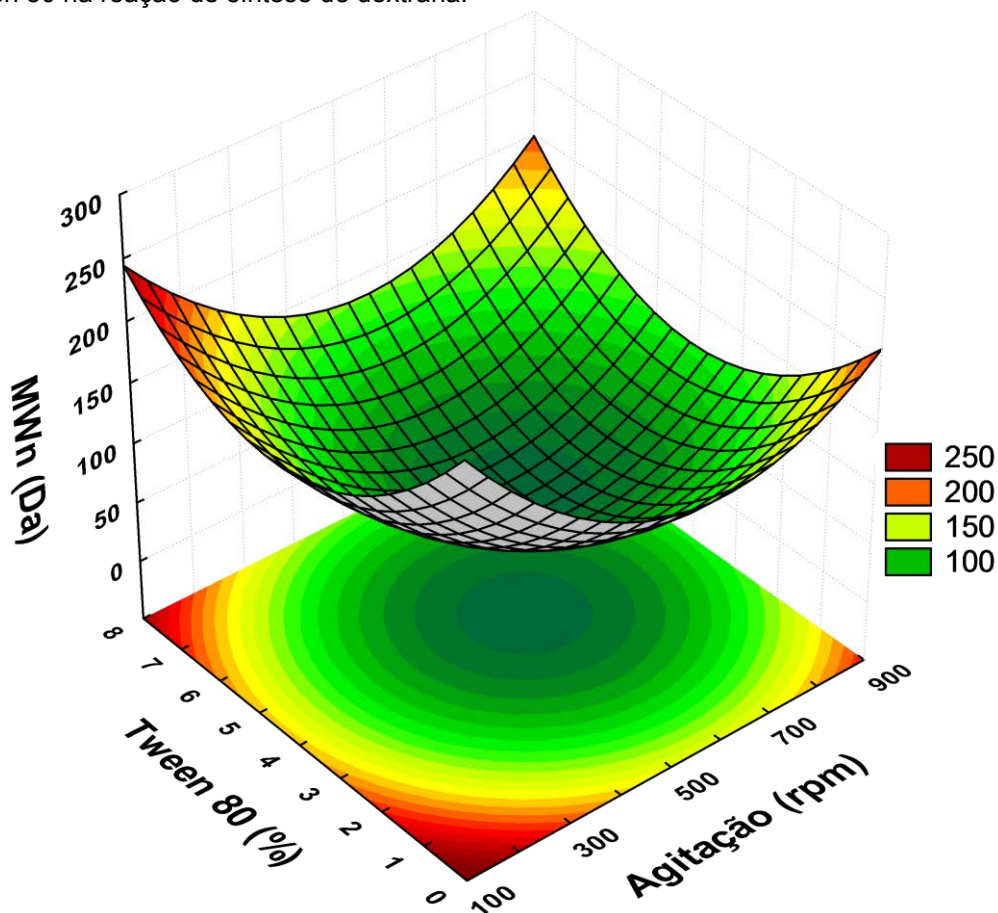
$$\text{MWn (Da)} = 56,7084 - 15,5676 A + 22,1405 A^2 - 6,8734 Tw + 22,4765$$

Equação 2.

Onde, A = agitação (rpm) e Tw = concentração de Tween 80 (%).

A superfície de resposta, obtida para a produção de dextrana sob influência de agitação e presença de Tween 80, após análise dos resultados obtidos pelo delineamento composto central rotacional, está representada pela Figura 26.

Figura 26. Superfície de resposta para a Variação do Número Médio da Massa Molecular da Dextrana produzida em função da velocidade de agitação e da presença de concentrações diferentes de Tween 80 na reação de síntese de dextrana.



Fonte: Dados do próprio autor

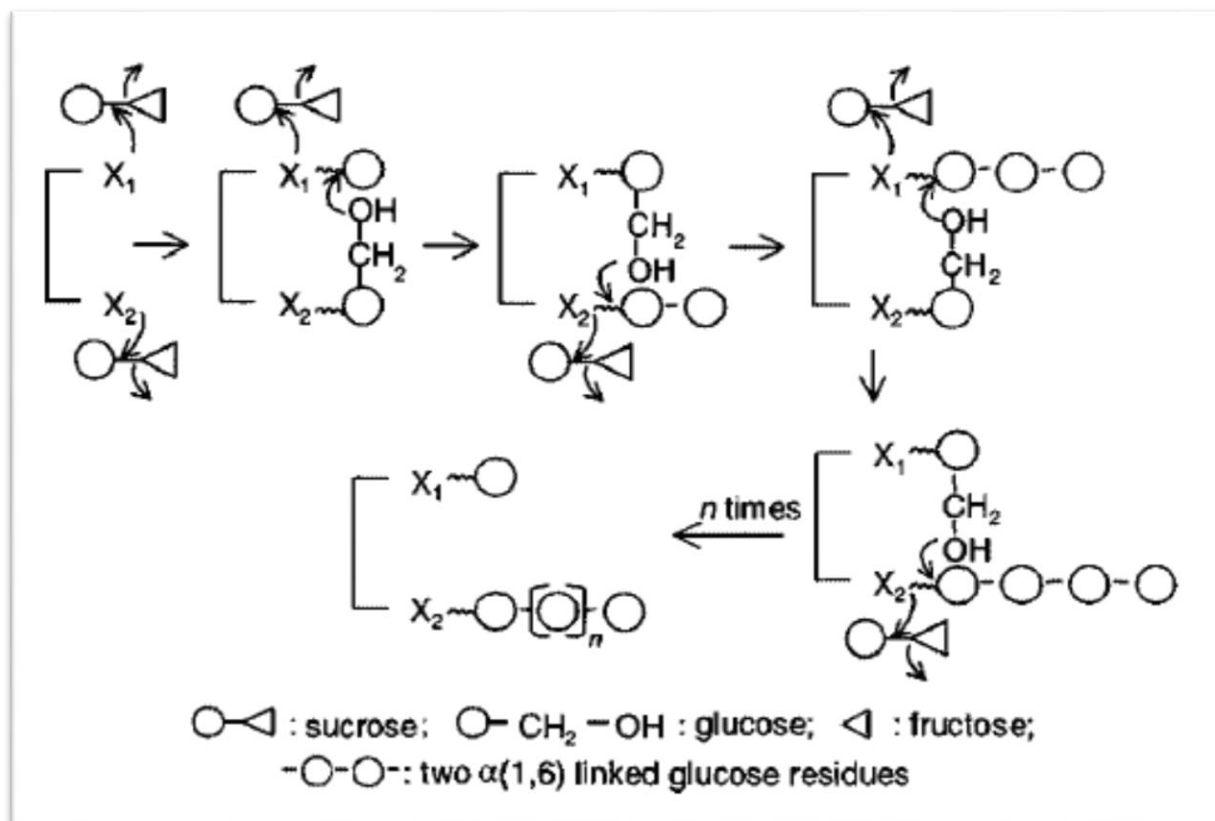
Analisando a superfície de resposta (Figura 26), é possível verificar que há uma diminuição no número médio da massa molecular da dextrana, com valores de concentração de Tween 80 variando entre 3 e 6 e de agitação variando entre 350 e 650 rpm. O ponto ótimo, obtido pelo programa Maple 9.5 (Waterloo Maple Inc., Waterloo, Ontário, Canadá), foi estabelecido em 4,27 % de Tween e 572,66 rpm de agitação.

Quando a dextrana se liga ao domínio não catalítico da dextranasacarase, a dextrana aparentemente induz uma conformação favorável para a síntese de dextrana. Existe evidência de que uma conformação favorável envolve a formação de múltiplas subunidades enzimáticas. Agregados de massa molecular bastante alta são formados quando a dextranasacarase é formada em meio de cultura que contenha sacarose (ROBYT; WALSETH, 1979; MILLER; EKLUND; ROBYT, 1986; ROBYT et al., 2008), onde a dextrana é sintetizada a partir

da sacarose pela dextranasacarase secretada pelas células bacterianas. O Tween 80 é considerado um estabilizante efetivo da enzima dextranasacarase, assim como a dextrana e o polietilenoglicol 2K (MILLER; ROBYT, 1984). O Tween 80 aparentemente destrói a estrutura agregada da dextranasacarase (KITAOKA; ROBYT, 1998). A destruição do aglomerado de enzimas diminui a produção de dextranas com alta massa molecular, uma vez que as enzimas não estão mais em uma conformação que favorece a formação de dextrana.

Estudos sobre mecanismos têm mostrado que a dextrana B-512F, que é sintetizada a partir de sacarose pela dextranasacarase, é formada via intermediários glicosídios. A metade glicosídica é transferida para o final redutor da cadeia glucanosídica em crescimento, sendo ligado covalentemente ao sítio ativo da enzima (NAESSENS et al., 2005). O mecanismo proposto por Robyt e colaboradores para a síntese de uma sequência de resíduos de glicose unidos por ligações α -(1,6) na dextrana B-512F envolve dois nucleófilos no sítio ativo, que atacam a sacarose e libera frutose gerando dois intermediários β -glicosídicos (Figura 27) (ROBYT; EKLUND, 1982; ROBYT, 1996).

Figura 27. Mecanismo proposto para a síntese de glucana α -(1,6) por dextranasacarase B-512F. X_1 e X_2 representam nucleófilos no sítio ativo da enzima.



Fonte: ROBYT, (1985).

De acordo com Robyt e Eklund, (1982), o grupo OH do C-6 de um resíduo de glicose ataca o C-1 de outro para formar a ligação α -(1,6) e um resíduo de glicose é transferido para outro. O nucleófilo liberado ataca outra molécula de sacarose formando o novo intermediário glicose-enzima. O grupo OH do C-6 deste novo intermediário ataca o C-1 da unidade isomaltosídica (que é a cadeia de dextrana em crescimento), a qual é transferida para o resíduo glicosídico. As unidades glicosídicas e dextranosídicas são alternadamente transferidas entre os dois nucleófilos assim que a cadeia da dextrana é formada no final redutor. A formação da cadeia termina e a cadeia liberada pode ser acoplada a uma nova cadeia, como ramificação, por ação de "acceptor reaction" (ROBYT; EKLUND, 1982; ROBYT, 1996).

A relação inversa do número médio da massa molecular da dextrana sintetizada com o aumento da agitação da reação de síntese é devido à processividade natural da polimerização da dextrana pela dextranasacarase. A processividade ocorre quando D-glicose da sacarose na reação enzimática é

continuamente adicionada à cadeia de dextrana que está covalentemente ligada ao sítio ativo da enzima, o aumento da agitação faz com que mais unidades de D-glicose encontrem o sítio ativo da enzima. Com a diminuição da agitação, menor número de resíduos de glicose encontrarão os sítios ativos das enzimas para se ligarem.

5.4 Conclusão

Foi comprovado que há uma diminuição no número médio da massa molecular da dextrana, com valores de concentração de Tween 80 variando entre 3 e 6 e de agitação variando entre 350 e 650 rpm. O ponto ótimo, obtido pelo programa Maple 9.5, foi estabelecido em 4,27 % de Tween e 572,66 rpm de agitação.

6. PRODUÇÃO DO COMPOSTO BROMO- DEXTRANA

6.1 Revisão bibliográfica

6.1.1 Epilepsia

O termo epilepsia significa mudança transitória de comportamento devido a disparos rítmicos e sincrônicos das populações de neurônios no Sistema Nervoso Central (SNC), mas também pode ser definida como distúrbio funcional no cérebro caracterizado pela ocorrência de crises periódicas e imprevisíveis (MCNAMARA, 1994). Segundo Letter, (1973), o distúrbio cerebral é caracterizado por manifestações clínicas espontâneas e recorrentes na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril. Este tipo de disfunção cerebral é caracterizado clinicamente por alterações subjetivas ou comportamentais súbitas (crises epiléticas), com tendência de se repetirem ao longo da vida do paciente (GUERRREIRO; GUERRREIRO; CENDES; LOPES-CENDES, 2000; CARLESSO, 2008).

A epilepsia é uma doença que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC) e que se caracteriza por convulsões e alterações paroxísticas temporais com tendência a recorrências (BERENDT; GREDAL; ALVING, 2004). Uma convulsão define-se como um episódio paroxístico transitório em que há atividade neuronal excessiva e/ou sincronizada no córtex cerebral, resultando numa variedade de manifestações clínicas (COCHRANE, 2007).

A epilepsia é mais do que convulsões, isto é, há uma grande variedade de fenômenos que podem refletir atividade convulsiva epilética. Apesar das convulsões serem sempre consideradas eventos anormais, é importante saber que nem todas as convulsões são provocadas pela epilepsia (THOMAS, 2000).

A epilepsia caracteriza-se por perda súbita de controle, manifestações paroxísticas (episódicas) em que as convulsões iniciam e cessam de forma súbita, e

os sinais clínicos dos ataques no indivíduo seguem um padrão repetitivo em que tanto os sintomas como a sua sequência permanecem idênticos de episódio para episódio (BERENDT, 2008).

Essas crises refletem uma atividade anormal, de início súbito, acometendo uma ou várias áreas do córtex cerebral. Essa alteração da atividade elétrica cortical, por sua vez, pode ser causada por um número de patologias estruturais e neuroquímicas (AL-NOORI; PIERSON; SWAN, 1998). As mudanças na excitabilidade neuronal que estão por trás da epileptogênese não só induzem atividade anormal em neurônios individuais, mas também recrutam uma massa crítica de células superexcitáveis em atividades altamente sincronizadas que são propagadas por vias normais ou patológicas (AVANZINI; FRANCESCHETTI, 2003).

A maioria destas descargas neuronais anormais provém da matéria cinzenta e distribui-se através das vias neuronais normais, afetando assim todo o sistema nervoso (KIRBY, 2008). As lesões que provocam crises epileptiformes localizam-se no córtex cerebral ou no diencefalo - sistema límbico, hipotálamo e tálamo (CHRISMAN et al., 2003). Dependendo da localização e extensão da descarga convulsiva, a apresentação clínica de uma crise pode variar bastante (QUESNEL, 2005). Por exemplo, uma lesão no córtex motor esquerdo irá produzir contrações musculares no lado direito do corpo; uma lesão no córtex visual poderá levar a que o animal tente apanhar moscas imaginárias; por outro lado, uma lesão no sistema límbico pode levar a alterações no comportamento do animal: vocalização excessiva, vícios ou sonolência (OLBY, 2008).

As convulsões estão geralmente associadas a distúrbios do Sistema Nervoso Autônomo, tais como micção, defecação, ptialismo e/ou vômito (CHRISMAN et al., 2003), assim como também pode haver alteração ou perda de consciência episódica, alterações psíquicas ou sensoriais e a presença de fenômenos motores anormais (BERENDT; GREDAL; ALVING, 2004).

É importante ressaltar que as crises epiléticas são resultado de descargas anormais excessivas em uma população de neurônios hiperexcitáveis, resultante de correntes elétricas que são fruto da movimentação iônica da

membrana celular. As crises epilépticas são uma das formas pelas quais se definem e classificam-se as epilepsias (AVANZINI; FRANCESCHETTI, 2003).

Grande parte das crises é gerada na estrutura cortical e hipocampal, embora outras estruturas subcorticais também estejam envolvidas em alguns tipos de crises. A expressão clínica de uma crise depende do seu local de origem, curso de tempo, e propagação da descarga (AVANZINI; FRANCESCHETTI, 2003). Existem dois aspectos essenciais para a classificação das crises epilépticas segundo a Liga Internacional Contra a Epilepsia (International League Against Epilepsy):

- a) a região cortical de origem e
- b) a alteração ou não da responsividade do paciente ao ambiente durante a crise.

Assim, quanto à área de origem as crises que derivam da disfunção de uma área cortical localizada, são denominadas crises (KORINTHENBERG et al., 2007) parciais, as que decorrem do acometimento simultâneo de múltiplas áreas corticais nos dois hemisférios (ou do córtex como um todo) são chamadas crises generalizadas (YACUBIAN, 2004; YACUBIAN, 2004).

Por outro lado, a preservação ou não da responsividade do paciente ao ambiente durante as crises classifica e qualifica as crises parciais. As crises parciais se subdividem em: simples - caracterizam-se pela preservação sem comprometimento da consciência; complexas - acompanhadas por alteração ao ambiente e com comprometimento da consciência; e parciais simples ou complexas - evoluindo para crises secundariamente generalizadas. As crises generalizadas (crises de ausência, crises de ausência atípica tônicas, clônicas, mioclônicas e atônicas) são aquelas em que desde o início, os achados clínicos e eletrencefalográficos sugerem o envolvimento de ambos os hemisférios cerebrais (YACUBIAN, 2004).

Estas crises se subdividem em convulsivas (sintoma motor predominante podendo haver ou não alteração da consciência) e não convulsivas (sem sinal motor muito evidente). A classificação das epilepsias e síndromes epilépticas é baseada nas semelhanças em relação ao tipo de crise, idade de início, sinais clínicos ou neurológicos associados, história familiar, achados

eletrencefalográficos e prognóstico. Não é correto considerar epilepsia como uma única síndrome, existem múltiplas síndromes epiléticas. A maioria das síndromes epiléticas, entretanto, não tem necessariamente causas comuns. Crises epiléticas são sintomas comuns de doenças neurológicas agudas ou manifestação clínica de doença sistêmica. Na avaliação ou no seguimento do paciente com epilepsia é central a questão da causa das crises epiléticas. Quase todas as doenças que atingem a substância cinzenta, algumas patologias de substância branca (ex: doenças metabólicas) e inúmeras doenças sistêmicas podem causar crises epiléticas. Três fatores causais podem estar envolvidos: predisposição individual, presença de lesão epileptogênica cerebral (local ou generalizada) e alterações bioquímicas ou elétricas cerebrais. Entre as causas da epilepsia podemos citar fatores genéticos e perinatais, distúrbios do desenvolvimento, doenças infecciosas, fatores tóxicos, trauma ou agentes físicos, distúrbios vasculares, metabólicos e nutricionais, doenças degenerativas e hereditárias (AL-NOORI; PIERSON; SWAN, 1998).

A epilepsia é mais prevalente em populações infantis, embora não existam fármacos antiepiléticos aprovados pelo FDA, especificamente desenvolvidos para esta população. A terapia corrente para estes é ainda associada com substancial incidência de efeitos colaterais indesejados, desconhecidos efeitos sobre o cérebro normal em desenvolvimento e, muitas vezes, uma substancial falta de eficácia contra crises (FRANCES; 2006; WOODBYRY; PIPPENGER; 1982; YACUBIAN, 2004).

6.1.2 Fármacos anticonvulsivos

A decisão de iniciar uma terapêutica anticonvulsiva deve ser baseada individualmente, em cada caso. O objetivo primordial da terapêutica é controlar a atividade convulsiva de forma adequada e com efeitos secundários aceitáveis por parte dos fármacos utilizados. O proprietário do animal deve estar perfeitamente ciente de que a completa eliminação das convulsões no seu animal de estimação pode não ser possível, mas que se espera que a terapia possibilite uma redução na severidade, duração e frequência da atividade convulsiva (THOMAS, 2000).

O “status epilepticus” pode ser fatal e, na epilepsia crônica, a eutanásia pode ser a única alternativa ao tratamento médico quando não se consegue reduzir a frequência das convulsões para um nível aceitável. De acordo com um estudo efetuado por Berendt, Gredal, Ersboll, Alving, (2007), o tempo médio de vida em cães diagnosticados com epilepsia é menor do que os outros cães em geral, sendo a idade média da morte de cerca de 7 anos. É importante perceber que, no caso das alterações extracranianas, há que tratar primariamente a causa subjacente das convulsões e que, uma vez resolvida, deixa de ser necessária qualquer terapia anti-convulsiva (PODELL, 1998).

A terapêutica anti-convulsiva está indicada em cães e gatos que apresentem epilepsia sintomática, “status epilepticus”, duas ou mais convulsões isoladas num período de 6 meses, 2 ou mais convulsões em cluster num período de 12 meses, quando a primeira convulsão ocorreu uma semana após um trauma craniano ou se os efeitos pós-ictus são severos, tais como cegueira prolongada ou mesmo agressividade (PODELL, 2004). Sempre que possível, os animais devem ser tratados com um único fármaco anti-convulsivo, de modo a diminuir a prevalência dos efeitos adversos, otimizar o comprometimento do dono, assim como reduzir os custos dos fármacos e da monitorização. Entre as vantagens da monoterapia está a inexistência de alterações medicamentosas, a possibilidade de uma maior previsibilidade das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco utilizado, a redução da probabilidade de ocorrerem efeitos adversos e, obviamente, ser mais barata (PODELL, 2004).

A resposta ao tratamento e as concentrações terapêuticas dos fármacos devem ser monitorizadas para determinar a dose ideal de fármaco para cada indivíduo. Se o fármaco inicial revela ser ineficaz mesmo que o nível sérico já seja considerado ótimo, então outro fármaco anti-convulsivo deve ser adicionado ou substituído. Se um paciente continuar com crises epileptiformes, mesmo que as concentrações terapêuticas se situem dentro do intervalo terapêutico, então há várias situações que podem estar a ocorrer, como o fato de haver um pobre compromisso por parte do dono ou do paciente ou devido a possíveis interações farmacológicas (PODELL, 1998).

Os fármacos que induzem as enzimas microsossomais hepáticas vão diminuir o tempo de semi-vida de eliminação do fármaco anticonvulsivo, diminuindo assim a concentração sérica da dose administrada. A situação mais comum, no entanto, é a presença de tolerância ou falta de eficácia, que pode ser de natureza metabólica ou funcional. Na tolerância metabólica cada vez mais quantidade de fármaco será necessária, de maneira a que seja possível manter as concentrações séricas terapêuticas desejadas. Este processo ocorre quando há indução das enzimas microsossomais hepáticas pelo próprio fármaco (autoindução) ou devido a medicação concomitante (PODELL, 1998).

A seleção do fármaco anti-convulsivo é baseada na sua eficácia, propriedades farmacocinéticas e efeitos adversos (PODELL, 2004). Os fármacos anti-convulsivos podem ser classificados em 3 categorias de acordo com os mecanismos gerais que reduzem tanto o início da convulsão como a sua distribuição: aumento dos processos inibitórios ao facilitar a ação do GABA (gama-aminobutírico), redução na transmissão excitatória e/ou controlo da condutância catiónica da membrana (PODELL, 2004). Os fatores que influenciam a escolha do fármaco incluem o estado geral do paciente, os custos, tipo de vida do proprietário e a sua disponibilidade, frequência da administração do fármaco, toxicidade do fármaco e o tipo e padrão convulsivo exibido pelo paciente (THOMAS, 2000). Apesar de a monoterapia ser preferível, cerca de 20-50% dos pacientes irão necessitar de uma terapêutica anti-convulsiva múltipla (COCHRANE, 2007).

6.1.3 Brometos

A partir de sua descoberta em 1826, os sais de brometo foram amplamente utilizados para o tratamento de hepatoesplenomegalia, sífilis e eczemas. Somente em 1857, Sir Charles Locock introduziu o brometo de potássio na terapêutica de seus pacientes com epilepsia (JOYNT, 1974; PEARCE, 2002).

Durante 59 anos, o elixir triplo de brometo (brometo de amônio, brometo de sódio e brometo de potássio) foi amplamente utilizado no tratamento das epilepsias com sucesso (YACUBIAN, 2004).

Com o advento do fenobarbital (1912) e da fenitoína (1937), deu-se início a era moderna dos fármacos antiepilépticos (FAEs). Estes substituíram os sais de brometo em função da menor toxicidade e maior eficácia (JOYNT, 1974; LEVY, MATTSON; MELDRUM, 1995). O brometo de sódio apresenta tempo de meia-vida no sangue humano de 10,5-14 dias, sendo necessários 40-50 dias para atingir o “*steady-state*”. Assim, é difícil se referir à concentração sangüínea e determinar a dosagem ou conduzir o monitoramento terapêutico do fármaco. Além disto, o nível sérico terapêutico desse fármaco é considerado próximo do nível tóxico. Os efeitos adversos do brometo são significantes e podem causar a morte, onde o bromismo severo está associado a uma concentração de brometo acima de 200 mg/dL e se manifesta por dor de cabeça, delírio e demência, que pode ser acompanhado de alucinações (RYAN; BAUMANN, 1999; TAKAYANAGI et al., 2002).

No entanto, os brometos permanecem ainda hoje como uma alternativa terapêutica para pacientes com epilepsias refratárias aos FAE's vigentes, particularmente em crianças, como crises refratárias tônico-clônicas ou com epilepsia mioclônica grave (BOENIGK; LORENZ; JURGENS, 1985; ERNST; DOOSE; BAIER, 1988; KAAGITANI-SHIMONO; IMAI; KAMIO; OKINAGA; TORIBE, 2005). Estudos clínicos recentes com brometos limitam-se à descrição de casos isolados.

EXEMPLOS DE CASOS ISOLADOS:

1o caso: Paciente de 15 meses de idade sofria de retardo de desenvolvimento como sequela de asfixia neonatal severa. Desde os 5 meses, foram notadas crises clônicas focais do membro superior esquerdo e face com distúrbio de consciência, ocasionalmente generalizadas secundariamente. Apresentava eletroencefalograma (EEG) ictal com descargas localizadas na região anterior direita. As crises tornaram-se mais frequentes e, aos 7 meses, a incidência excedia 50 ou 60 por dia. Aos 8 meses, sua consciência e respiração estavam afetadas devido às crises recorrentes frequentes. Regimes terapêuticos com outros fármacos anticonvulsivantes foram tentados, mas sem bons resultados. Aos 15 meses, brometo de potássio (KBr) oral, em dose máxima de 80 mg/kg/dia, foi adicionado ao regime terapêutico, controlando as crises completamente em 1 mês. (MEIERKORD et al., 2000).

2o caso: paciente de 8 anos de idade, vinha sendo acompanhado devido a um retardo psicomotor de origem desconhecida desde os 2 meses de idade. Aos 4 meses, desenvolveram-se crises audiogênicas mioclônicas, e estas se transformaram em hemiconvulsões direitas ou esquerdas frequentemente associadas à generalização secundária desde os 16 meses. Apesar da administração de vários anticonvulsivantes orais, as crises eram diárias e o paciente frequentemente atingia *status epilepticus* (SE). Esta paciente passou a receber KBr 86mg/kg/dia em monoterapia. As crises tornaram-se menos frequentes e de menor intensidade depois de 4 dias a partir da administração, cessando por completo no 18o dia (TAKAYANAGI et al., 2002). Estudo recente num centro de epilepsia na Alemanha investigou a eficácia e tolerância do brometo de potássio em 113 pacientes (1 a 20 anos) com epilepsia grave e crises tônico-clônicas generalizadas. A dose inicial foi de 45 mg/kg e aumentada para 70 mg/Kg. 49% dos pacientes não tiveram crises nas últimas quatro semanas do estudo e 31% mostraram uma diminuição maior que 50% (KORINTHENBERG et al., 2007).

Outro estudo demonstra a efetividade do brometo de sódio (30-50mg/Kg/dia) para o tratamento da síndrome Wolf-Hirschorn. Esta patologia é caracterizada por uma deleção parcial do braço curto do cromossomo 4. Os pacientes apresentam crises refratárias e facilmente desenvolvem SE. A eficácia do brometo de sódio neste estudo foi de 100% em quatro indivíduos tratados com este fármaco (KAGITANI-SHIMONO et al., 2005).

6.1.4 Brometo de Potássio

O brometo é normalmente administrado como brometo de potássio, mas também pode ser administrado como brometo de sódio em solução ou em cápsulas (THOMAS, 2000). O brometo de sódio é preferível quando há insuficiência da adrenal (doença de Addison) ou doença renal que podem impedir a homeostasia normal do potássio (PODELL, 1998). O brometo de potássio tem sido o substituto do fenobarbital como fármaco anticonvulsivo de primeira escolha em cães (QUESNEL, 2005), uma vez que não provoca toxicidade hepática e os seus efeitos adversos são completamente reversíveis com a interrupção da sua administração (PLATT, 2005).

O efeito antiepiléptico para as convulsões generalizadas é tão eficaz como o fenobarbital (PARENT, 2004). Contudo, desde cedo, o brometo de potássio tem sido associado ao fenobarbital, e pode ser que seja desta combinação de ambos os fármacos que a torne tão eficaz (PARENT, 2004). O brometo de potássio controla aproximadamente 80% dos cães epiléticos, sendo muitas vezes eficaz em cães refratários a terapia com fenobarbital (PLATT, 2005). Quando altas doses de brometo de potássio são associadas a doses baixas de fenobarbital, aproximadamente 95% dos cães com crises epileptiformes conseguem ser controlados (PLATT, 2005).

O mecanismo de ação não está ainda bem esclarecido. Pensa-se que este fármaco atue através da hiperpolarização das membranas pós-sinápticas, causada pela entrada do brometo através dos canais de cloro (BERENDT; GREDAL; ALVING, 2004; CHANDLER, 2006). Recentemente, tem-se demonstrado que o brometo aumenta a atividade GABAérgica (CHANDLER, 2006). O brometo de potássio é rapidamente absorvido depois de administrado oralmente. Não se liga às proteínas plasmáticas, podendo deste modo difundir-se livremente pelas membranas (BERENDT; GREDAL; ALVING, 2004). O tempo de semi-vida é prolongado, sendo aproximadamente 25 dias nos cães e 11 dias nos gatos (NELSON; COUTO, 2005). Consequentemente, são necessários cerca de 4 meses para que se atinjam níveis séricos constantes após o início da terapêutica (BERENDT; GREDAL; ALVING, 2004).

O brometo de potássio é excretado por via renal e é dependente da ingestão de cloro dieta, já que esta influencia a excreção dos brometos (BERENDT; GREDAL; ALVING, 2004). À medida que a percentagem de cloro na dieta aumenta, a absorção do brometo diminui e a sua excreção renal aumenta, resultando numa redução dos níveis séricos de brometo de potássio (CHANDLER, 2006). Sendo assim, o tempo de semi-vida do brometo de potássio pode ser variável, sendo dependente do conteúdo de sal na dieta e da função renal (OLBY, 2008).

Ao permitir a redução do uso de fármacos metabolizados no fígado, a terapêutica com brometo de potássio reduz a incidência de hepatotoxicidade (PODELL, 1998). Quando usado como anticonvulsivo de primeira escolha

demonstra ser tão eficaz como o fenobarbital, com a vantagem adicional de não potencializar toxicidade nem intolerância individual (QUESNEL, 2005)

6.1.5 Efeitos colaterais do brometo de potássio

Os efeitos colaterais causados no sistema nervoso, pele e no trato intestinal foram rapidamente reconhecidos, desde que o brometo de potássio começou a ser utilizado, sendo que estes sintomas adversos eram abundantes justamente no momento da determinação da dosagem sem monitoramento farmacológico, sendo que estes efeitos colaterais eram tidos como indicativo de medição para a eficiência do medicamento.

O uso contínuo de brometos como droga antiepiléptica diminuiu abruptamente, devido principalmente a estes efeitos colaterais e pelo advento de drogas modernas, que eram realmente viáveis e mais fáceis de serem administradas. De toda forma, os brometos continuam sendo usados em casos refratários sob instruções epileptológicas especializadas (LIVINGSTON; PEARSON, 1953; DREYER, 1972).

Em 1980 houve um renascimento do uso do brometo de potássio, principalmente na Alemanha e Japão. Isto se deu pela observação de que o brometo tem atividade limpa, com taxas de resposta entre 30 e 70%, incluindo contra síndromes epilépticas severas na infância como outra forma de tratamento de convulsões tônico-crônicas (BOENIGK et al., 1985; ERNST et al., 1988; WOODY, 1990; TANAKA; MIMAKI; TAGAWA, 1990; STEINHOFF; KRUSE, 1992; OGUNI et al., 1994; OKUDA et al., 2000; TAKAYANAGI et al., 2002; STEPHANI; BOENIGK; BORUSIAK, 2004).

Em adição aos relatórios originais, uma série de artigos “reviews” sumarizaram diversas experiências clínicas e farmacológicas (CARNEY, 1971; BOENIGK et al., 1985; STEINHOFF, KRUSE, 1992; SCHNEBLE, 1993; DIENER, 1997; DIENER, SORNI, RUILE, 1998; RYAN, BAUMANN, 1999; FRIEDLANDER, 2000). Embora estas publicações ilustrem experiências amplas com brometo de potássio em centros especializados, o número de estudos em farmacologia, eficácia

e tolerância sob condições modernas de monitoramento é pequeno quando comparado com outras drogas epiléticas (KORINTHENBERG et al., 2007).

Estes efeitos colaterais incluem cansaço, perda de apetite e de peso, sonolência e déficit de concentração, além de acne, dermatite perioral e pálpebras inchadas, distúrbios gastrointestinais e mudanças de humor.

6.1.6 Mecanismo de ação

A sua atividade farmacológica tem sido investigada, mas ainda permanece sem uma completa elucidação. Dois mecanismos principais foram propostos para explicar a ação antiepilética: hiperpolarização neuronal, através da geração de potenciais pós-sinápticos inibitórios gerados pelo influxo facilitado de íons brometo, e acidose extracelular, gerada a partir da interação com a enzima carbonoanidrase (LEVY et al., 1995; WOODBYRY; PIPPENGER, 1982).

Em um estudo realizado por Meierkord e colaboradores, foi analisado o efeito do brometo de sódio (NaBr) em fatias de córtex de ratos em dois modelos diferentes de epilepsia (baixo Ca^{++} e baixo Mg^{++}). O brometo de sódio reduziu as frequências e bloqueou as descargas induzidas por baixo Ca^{++} e as descargas recorrentes induzidas por baixo Mg^{++} de uma maneira concentração-dependente (MEIERKORD et al., 2000). Também se testou a hipótese de um possível envolvimento do NaBr na acidificação do meio extracelular (MONTROYA; RIKER, 1982) através da inibição da enzima anidrase carbônica, sendo comparado com a acetazolamida.

No entanto, o NaBr não teve efeito na acidose e somente aumentou a alcalose. Neste mesmo trabalho através de um protocolo de estimulação pulso-pareado, usado para monitorar a eficácia da inibição gabaérgica em concentrações de 5 mM de NaBr, foi verificado um aumento significativo na amplitude inibitória pós-sináptica em culturas de neurônios hipocámpais (MEIERKORD et al., 2000).

Em células ganglionares de rã o brometo de sódio causa hiperpolarização quando ocorre substituição equimolar de cloreto de sódio (112mM) por NaBr em solução de Ringer e também exibe mínimos efeitos excitatórios

sinápticos. A hiperpolarização poderia ter ocorrido em consequência da maior permeabilidade da membrana pelo brometo do que ao cloreto (MONTROYA; RIKER, 1982). Em culturas de neurônios corticais de ratos foi investigado o efeito do brometo em correntes ativadas por ácido gama-aminobutírico (GABA), empregando técnicas de clampeamento de corrente e registro intracelular.

Esses achados sugerem que o brometo potencializa correntes ativadas por GABA em uma concentração terapêutica de 10 mM para 20 mM, determinando uma grande hiperpolarização induzida por GABA. Baseado nestes achados foi postulado que o efeito do brometo pode ocorrer através da potenciação de potenciais pós-sinápticos inibitórios (PIPS) obtidos pelo GABA (SUZUKI, et al., 1994).

6.1.7 O uso de dextrana como veículo de drogas

Os benefícios terapêuticos de um número considerável de drogas administradas em forma de dosagem tradicional são algumas vezes limitados por barreiras fisiológicas, efeitos fisioquímicos indesejáveis ou toxicidade. Agentes terapêuticos, que tem seu sistema de liberação *in vivo* modificado, são desejados, pois tem sua eficiência melhorada, mantém sua ação por mais tempo ou têm seus efeitos colaterais diminuídos. Em tais casos o desenvolvimento de sistemas liberadores de drogas *in vivo* tem sido objeto comum de pesquisa, uma vez que o controle da liberação da droga no organismo pode melhorar os efeitos terapêuticos observados. Sistemas poliméricos de liberação, tais como microesferas, nanoesferas e filmes poliméricos têm sido extensivamente pesquisados com o intuito de modificar a liberação de drogas.

Desde 1950, uma variedade de drogas tem sido covalentemente ligada a muitos polímeros naturais e sintéticos. Por ser bastante reativa, a dextrana pode ser extensamente utilizada como veículo de drogas ligadas à sua estrutura. Com metais alcalinos e alcalinos terrosos, a dextrana forma dextranatos alcoóxidos (COHEN, ZILKHA, 2003).

Várias propriedades físico-químicas como massa molar, forma, flexibilidade, carga, balanço hidrofobicidade/lipofobicidade são características determinantes para o uso farmacocinético da dextrana (MEHVAR, 2003). Conjugados de dextrana podem também ser ligados reversível ou irreversivelmente. Ligações irreversíveis de conjugados são obtidas por técnicas de imobilização e incluem conjugados de enzimas, complexos hormonais e complexos metálicos. Conjugados reversíveis incluem ésteres, éteres e amidas. Derivados da dextrana, nos quais o ligante é irreversivelmente ligado ao condutor, tem sido extensivamente empregado em medicina experimental e tem sido utilizado em muitas aplicações biotecnológicas e em áreas correlatas (YALPANI, 1986).

As enzimas são reguladores naturais de processos bioquímicos e o potencial da terapia enzimática é agora aceito na maioria dos campos da medicina. Com o intuito de acoplar enzimas aos polímeros de dextranas, inúmeras reações têm sido adaptadas, que inicialmente foram desenvolvidas para imobilização enzimática em suporte polissacarídeo insolúvel. Esta abordagem tem sido utilizada para obter conjugados solúveis de dextrana com várias enzimas, que oferecem várias vantagens como aumento da estabilidade enzimática no pH fisiológico, aumento da meia vida da enzima, melhor estabilidade térmica, baixo risco de reações alergênicas de emergência em administrações repetitivas (MARSHALL, 1978).

Carboximetil dextrana, sulfato dextrana, dietilaminoetil dextrana (DEAE) são derivados de dextrana carregada que formam complexos com várias entidades químicas. Hormônios como a oxitocina e a vasopressina têm sido ligados à dextrana para aumentar sua solubilidade em água mantendo sua atividade (SNELL; SMYTH, 1977). Melhoras da eficiência terapêutica da isometamidium (ALIU; CHINEME, 1980) e redução da nefrotoxicidade da gentamicina (KIKUCHI et al., 1988) foram reportadas quando estas drogas foram administradas na forma de complexos sulfatados de dextrana.

Os complexos de dextrana com metais como o ferro e o antimônio são relativamente fáceis de obter pela reação de sais com o polímero em solução aquosa seguido de precipitação de derivados macromoleculares com álcool. A administração parenteral do complexo dextrana-ferro tem sido empregada para a

rápida regeneração da massa celular vermelha no tratamento da anemia e em pacientes com intolerância às formas orais de ferro (PORTER; BLACKBURN; BISTRIAN, 1988). Antimônios pentavalentes são bastante efetivos no tratamento da leishmaniose, mas eles são excretados rapidamente na urina e tem curta duração da ação. Desta forma, o antimônio tem sido complexado com a dextrana, que após injeções intramoleculares é lentamente absorvido do local da aplicação e suficientes níveis do medicamento no sangue são mantidos para a supressão efetiva da infecção por *Leishmania donavani* (MIKHAIL; MANSOUR, 1975). Cisplatinum (II) tem sido complexado com dextrana carboximetil e tem sido relatado sua citotoxicidade *in vitro* contra 5 murina e dois tumores humanos (SCHECHTER et al., 1986).

A dextrana preenche muita das características ideais de um bom condutor de medicamentos, por ser atóxica, não-imunogênica e não-antigênica. A dextrana contém um grande número de grupos hidroxílicos viáveis para a fixação de drogas. A dextrana pode ser autoclavada e é estável quimicamente à manipulação. Conjugados de dextranas são facilmente caracterizados devido à sua estrutura homogênea.

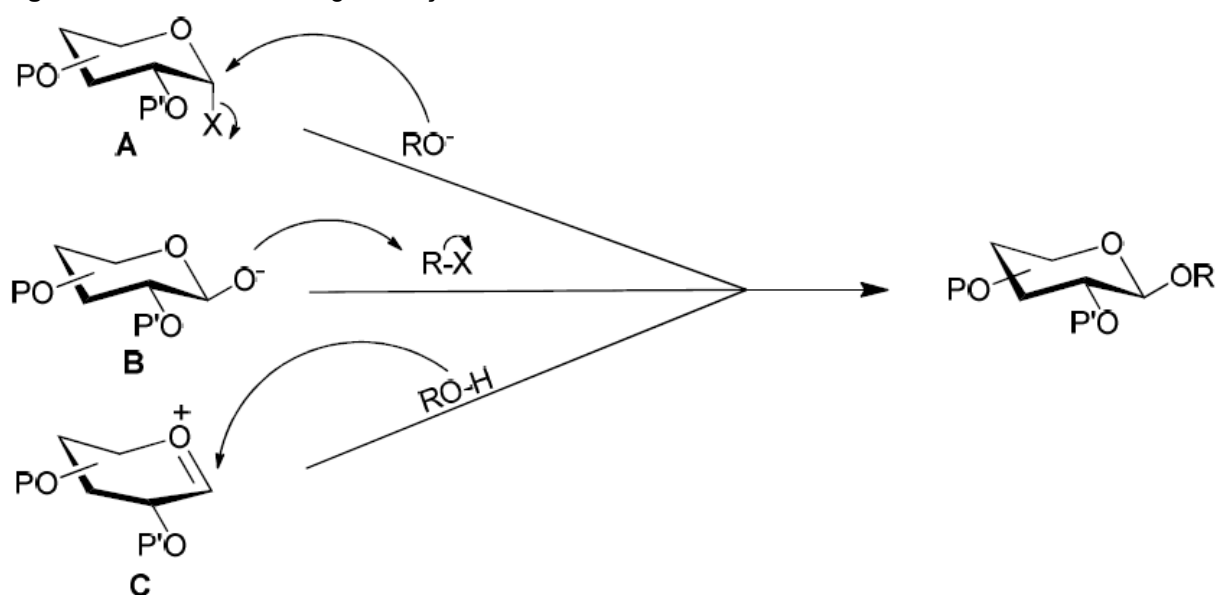
A quimioterapia pode ser melhorada pelo uso de polímeros, que mantém por tempo prolongado os níveis exigidos de drogas no organismo. O conjugado dextrana-daunomicina não apresenta os mesmos efeitos colaterais que o medicamento não conjugado, como danos ao coração e ao fígado (HURWITZ; WILCHEK; PITHA, 1980).

Efeitos colaterais gastrointestinais constituem o tipo de reação adversa mais freqüente quando se administra drogas antiinflamatórias não-esteróides. O Flurbiprofen, por exemplo, causa distúrbios gastrointestinais e ulceração péptica. A conjugação do Flurbiprofen com a dextrana de diferentes massas molares tem se mostrado avanços nas propriedades físico-químicas, melhor especificidade e diminuição dos efeitos colaterais. (SHRIVASTAVA; JAIN; TRIVEDI, 2003)

6.1.8 Ligações glicosídicas

Alguns métodos são viáveis para sínteses por ligações glicosídicas. Geralmente, a formação de ligações glicosídicas requer um grupo abandonador tanto no doador quanto no aceptor. A saída do grupo abandonador se dá pela ação do catalisador. A maioria das sínteses por ligações glicosídicas envolvem um dos três mecanismos A, B e C (Figura 28). O mecanismo A envolve deslocamento S_N2 do grupo abandonador por um grupo nucleófilo. No mecanismo B, um doador nucleófilo desloca o grupo abandonador do aceptor como S_N2 , sendo este mecanismo o menos popular. No mecanismo C, o nucleófilo álcool ataca o centro anomérico eletrofílico que é gerado *in situ* por uma espécie doadora apropriada (AHMED, 2013).

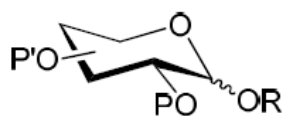
Figura 28. Mecanismos de glicosilação.



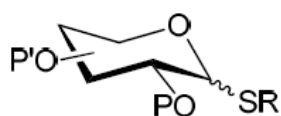
Fonte: AHMED, (2013).

Para que ocorra uma ligação glicosídica é necessário um doador adequado. Doadores glicosídicos modernos apresentam as seguintes características: condições suaves de ativação, alta estabilidade frente às manipulações dos grupos protetores e acessibilidade versátil (deve reagir com a maioria dos álcoois). Doadores glicosídicos podem ser classificados de acordo com a natureza do grupo abandonador: derivado O-glycosyl, derivados S-glicosídico e derivados X-glicosídicos, como mostrado na Figura 29 (AHMED, 2013)

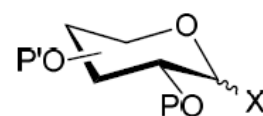
Figura 29. Categoria de doadores glicosídicos.



O-derivatives:
imidates, phosphates,
phosphites....



S-derivatives:
thioglycosides, sulfones,
sulfoxides....

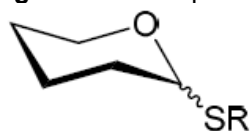


X-derivatives:
fluorides, chlorides,
bromides and iodides

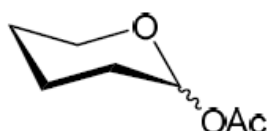
Fonte: AHMED, (2013)

Alguns exemplos de doadores glicosídicos estão dispostos na Figura 30, dentre os quais, os doadores glicosídicos mais comumente usados são os imidatos (FAIRBANKS; SEWARD, 2003) e os tioglicosídios (KARTHA; FIELD, 2003).

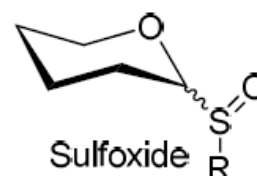
Figura 30. Exemplos de doadores glicosídicos.



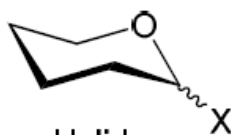
Thioglycoside
R = Tol, Et etc



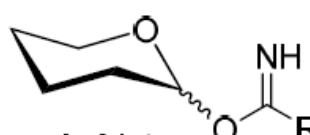
Acetate



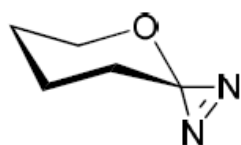
Sulfoxide



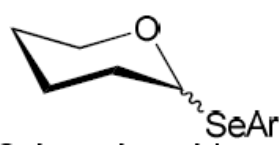
Halide
X = F, Cl, Br, I



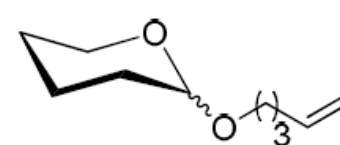
Imidate
R = CCl₃, CF₃



Diazirine



Selenoglycoside

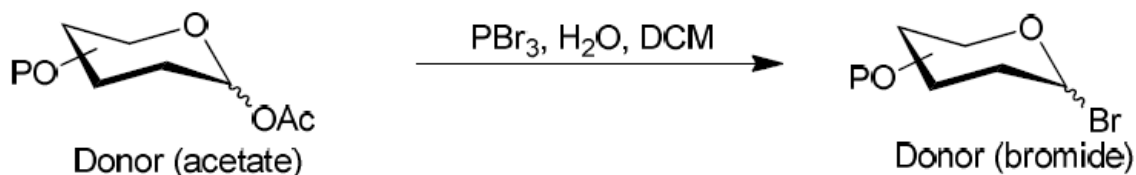


Pentenyl glycoside

Fonte: FAIRBANKS, SEWARD, (2003).

Em muitos casos, um doador pode ser convertido a outro usando os reagentes apropriados. Por exemplo, um acetato glicosídico pode ser facilmente convertido a brometo glicosídico usando PBr₃ em diclorometano (Figura 31).

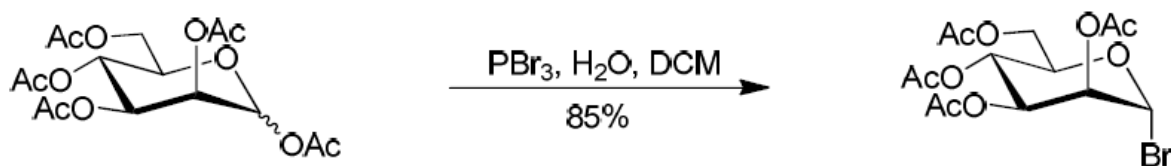
Figura 31. Conversão de um doador em outro.



Fonte: AHMED, (2013).

O composto brometo-manose pode ser sintetizado a partir de um açúcar completamente acetilado. A reação da manose acetilada com $\text{PBr}_3/\text{H}_2\text{O}$ produz o brometo glicosídico com 85% de rendimento (Figura 32)

Figura 32. Síntese do composto brometo glicosídio.



Fonte: (AHMED, 2013).

Uma patente americana de produção de blocos de copolímeros de polissacarídeos e óxidos de polialquilenos para uso na prevenção da agregação de bactérias ou coagregação em sistemas aquosos ou em processos de fermentação, propõe a produção do composto acetobromodextrana, como etapa inicial da preparação do composto de blocos duplos de dextrana-polietilenoglicol (SAPALTRO et al., 1994).

Nesta patente a síntese do composto acetobromodextrana é realizada inicialmente pela ação de 200 mL de anidrido acético em presença de ácido perclórico sobre 50g de dextrana (6kDa) aquecidos a 60-70°C por 1 hora. Após o resfriamento da reação à temperatura ambiente, 0,5 g de fósforo vermelho é adicionado à mistura e 1 mL de bromo é, então adicionado lentamente seguido da adição gota a gota de água (0,6 mL).

A reação permanece à temperatura ambiente por 2 horas. O excesso de líquido é evaporado à baixa pressão e o resíduo é ressuspense em 250 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e filtrado. Este procedimento é realizado até que o filtrado se torne neutro, quando deve ser lavado apenas com água e seco em forno a vácuo.

Foram relatados na literatura outros métodos de esterificação de polissacarídeos, tais como o uso do cloreto de acetila com piridina (TERAMOTO; SHIBATA, 2006), anidrido acético com piridina e 4-(dimetilamino)piridina (LIEBERT; HUSSAIN; HEINZE, 2005; TEZUKA, 1998), ácidos carboxílicos *in situ* ativados com cloretos de tosila (HUSSAIN; 2008; LIEBERT et al., 2006; HEINZE et al., 2003), cloreto de iminium (HUSSAIN; LIEBERT; HEINZE, 2004a) e 1,1'-carboildiimidazol (HUSSAIN; HEINZE, 2008; HUSSAIN et al., 2004a; HUSSAIN; LIEBERT; HEINZE, 2004b) e anidrido acético ativado com ácidos fortes ou catalisadores metálicos.

Considerando o anidrido acético como um reagente convencional para a esterificação da dextrana, outro grupo de pesquisa da Alemanha estudou a acetilação da dextrana, usando iodo como catalisador (MEMMI et al., 2005). Este método de esterificação é mais vantajoso quanto aos custos efetivos porque a maioria dos métodos viáveis necessita de reagentes de acetilação caros, como o cloreto sulfonílico de p-tolueno (HEINZE et al., 2003), 1,1'-carbonildiimidazol (HUSSAIN; LIEBERT; HEINZE, 2004a), etc.

Outro ponto importante em não utilizar ácidos como catalisador é porque as ligações glicosídicas dos polissacarídeos são destruídas. O iodo é um reagente barato, comercialmente disponível, ecologicamente amigável e o mais importante é um reagente poderoso, devido a sua atuação como catalisador em vários substratos e transformações orgânicas já foi relatada (MEMMI et al., 2005; PHUKAN, 2004).

6.1.9 Estocagem

O composto bromodextrana é estável por 2 a 3 anos estocado a -20 °C (WINSLOW; VANDEGRIFF; INTAGLIETTA, 1997).

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Hidrólise Ácida da Dextrana

A acetobromação da dextrana estava prevista para ser realizada com dextrana de baixa massa molar média (6.000 Da). Foi feito um estudo para hidrolisar a dextrana (100 kDa) em HCl e obter dextrana de baixa massa molar, devido ao alto preço da dextrana comercial de massa molar controlada.

Foram realizados testes de hidrólise da dextrana (10mg/mL) em solução de HCl entre 1,0 e 1,5M em diferentes temperaturas, com ou sem uso de ultrassom. Amostras de 500 µL foram retiradas em 1, 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos, congeladas imediatamente e algumas destas amostras foram aplicadas em placa de cromatografia de camada delgada (Polygram sel G/UV).

Uma alíquota de 1 µL de cada amostra da hidrólise e padrão de glicose foram aplicados à 15 mm a partir da base da placa de CCD (Polygram sel G/UV), com micro seringa Hamilton.

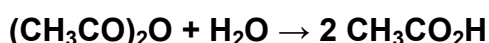
Os tamanhos das aplicações foram mantidos entre 2 e 3 mm pela adição de 1 µL por vez, secando nos intervalos. A placa foi irrigada até o topo de 20 a 22°C usando acetonitrila/acetato de acetato de etila/1-propanol/água 85:20:50:70 (v/v/v/v) em uma ascensão. Após a separação, os carboidratos puderam ser visualizados pelo mergulho da placa de CCD em solução de etanol contendo 0,5% (m/v) α -naphthol e 5% (v/v) H₂SO₄. Após a secagem, a placa de CCD foi colocada em forno por 10 minutos a 120°C.

6.2.2 Acetobromação da Dextrana

O procedimento sugerido no projeto foi adaptado de: Redemann, Niemann, (1955) e (1942) foi alterado em algumas etapas, além de que foram testados três diferentes catalisadores para a reação (piridina, ácido sulfúrico e iodo). Tais ensaios foram realizados no departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP)

6.2.3 Procedimento de acetilação da dextrana

A dextrana previamente hidrolisada e toda a vidraria utilizada nesta etapa foram secas em estufa por 14h à 115°C, para garantir a ausência de água no meio reacional, porque o anidrido acético é instável em água, como a maioria dos anidridos de ácido, o anidrido acético se hidrolisa dando ácido acético (CELANESE, 2012).



A dextrana foi pesada (1,411 g) e transferida para balão redondo de 50 mL de volume. Uma barra de agitação foi colocada no interior deste balão e em seguida foram adicionados, com auxílio de uma pipeta, 30 mL de anidrido acético. O balão foi fixado com presilhas e apoiado sobre um vasilhame que continha óleo de silicone no seu interior (necessário para distribuir o calor ao redor do balão, durante o aquecimento). O vasilhame com óleo de silicone foi colocado sobre um aquecedor/agitador.

A agitação foi iniciada e em seguida, foram adicionados os catalisadores a serem testados separadamente (1,5 mL de piridina, 0,5 g de iodo e 1 gota de ácido sulfúrico), ou seja o experimento foi repetido igualmente para cada um destes catalisadores. O frasco foi acoplado a um condensador de refluxo, a junção foi vedada com fita veda rosca. (Figura 33).

Figura 33. Balão de reação, contendo em seu interior dextrana, catalisador e anidrido acético, sobre óleo de silicone e acoplado a condensador.



Fonte: Dados do próprio autor.

Acima do condensador de refluxo, foi adaptada uma válvula de segurança feita com uma bexiga de borracha. O conjunto foi aquecido à 50°C com agitação, ficando em refluxo por 4h.

6.2.4 Bromação da dextrana acetilada

Das misturas reacionais da acetilação anterior, foram retirados 2 mL, de cada uma, para análise de ^1H -RMN. A mistura foi concentrada em rotavapor à 100°C até não haver mais líquido aparente. Os balões foram colocados em refrigerador à 4°C para resfriar.

Foram adicionados 5 mL de anidrido acético para homogeneização completa da dextrana acetilada e em seguida 30 mL de solução de HBr em ácido acético 33% gelado. Os balões foram vedados com uma rolha de silicone e uma bexiga de borracha conectada a uma agulha foi inserida na rolha de vedação do balão. Os conjuntos ficaram em repouso à 4°C por 24h e em seguida, concentrados em evaporador rotativo até 60°C (temperatura máxima permitida) até não haver mais líquido aparente. Após esfriamento do balão, cerca de 35 mL de éter isopropílico foram adicionados ao produto formado, o balão foi levemente aquecido para completa homogeneização e deixado em repouso por 2 horas à 4 °C.

O produto foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi transferido para placa de Petri e seco em estufa à 50°C, sob vácuo, triturado e armazenado. O produto seco foi preparado para análise de ^1H -RMN.

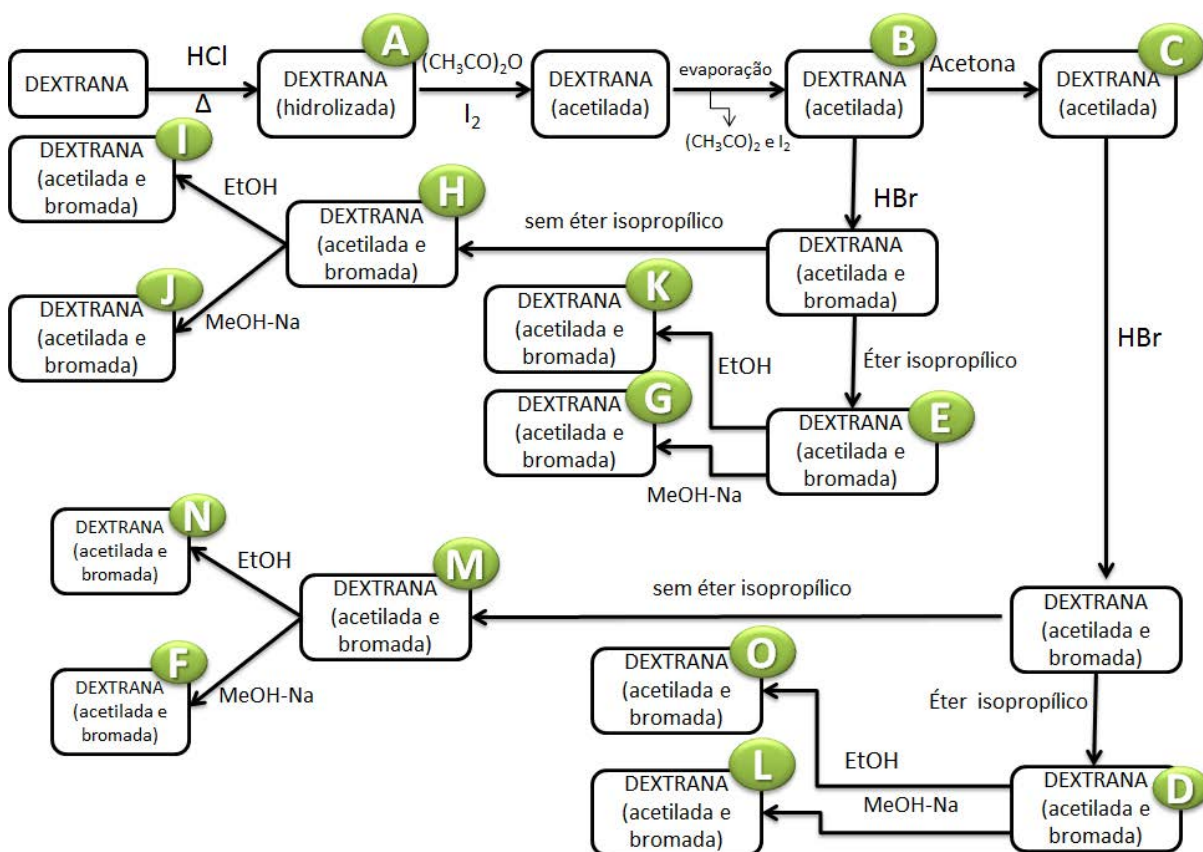
6.2.5 Espectroscopia de ^1H NMR

Os espectros de ^1H NMR dos produtos das reações de síntese do composto bromo-dextrana, utilizando os diferentes catalisadores foram obtidos em DMSO usando um Bruker spectrometer a 500 MHz (Germany).

6.2.6 Otimização da rota de síntese do composto bromo-dextrana

Para determinar quais etapas poderiam ser executadas, sem que houvesse danos ao produto final, foi realizada uma bateria de procedimentos com modificações em algumas etapas, após a determinação do catalisador a ser usado, como lavagem ou não com acetona antes da bromação, lavagem ou não com etanol após bromação, uso ou não de éter isopropílico no produto final, desacetilação ou não com MeOH-Na após bromação. Todas estas modificações foram testadas, as amostras foram secas e analisadas por FTIR e por análise qualitativa com ácido sulfúrico. A Figura 34 dispõe cada rota e os pontos de retirada de cada amostra.

Figura 34. Esquema de testes para determinação das variáveis da reação.



Fonte: Dados do próprio autor.

Assim que foi concluída a melhor rota para a síntese do composto bromo-dextrana, foi feita a aquisição de 550 g de dextrana 100 kDa da Sigma-Aldrich para síntese do composto em escala maior para enviar para os testes “in

vivo” que poderão ser realizados para verificação da potencialidade deste composto no tratamento da epilepsia

6.2.7 Análise de espectrofotometria de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro de Fourier Transform Infrared (FT-IR) para as amostras coletadas durante cada etapa descrita pela rota representada pela Figura 34, de síntese do composto bromo-dextrana foram obtidos pelo preparo de pastilha com 150 mg de KBr e 5 mg do composto estudado, sob pressão à 40 KN, usando espectrofotômetro FT-IR (Shimadzu), com obtenção de espectros de 4000 à 500 cm^{-1} .

6.2.8 Análise qualitativa quanto à presença de bromo ligado à dextrana.

Uma pequena amostra, uma ponta de espátula, foi colocada em um tubo de ensaio e algumas gotas de H_2SO_4 foram adicionadas. O conjunto foi levemente agitado. Deve-se verificar a cor dos vapores desprendidos.

O contato do brometo com H_2SO_4 gera vapores de marrom a alaranjado e o contato do iodeto com H_2SO_4 gera vapores violetas.

6.2.9 Análise quantitativa de Brometo

A análise quantitativa de brometo no composto formado foi realizada pela adaptação da determinação espectrofotométrica indireta de traços de brometo em água (FISHMAN; SKOUGSTAD, 1963).

Esta análise é baseada no efeito catalítico do brometo na oxidação do iodeto a iodato por permanganato de potássio em ácido sulfúrico.

Frascos de separação de borosilicato foram usados para todas as determinações. Devido à sensibilidade do método, toda a vidraria utilizada foi lavada com solução diluída de HCl e água deionizada antes do uso.

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade analítica.

6.2.10 Solução de Permanganato de Potássio (0,04M)

Permanganato de potássio (6,32g) foi dissolvido em água desmineralizada e diluída para 1L. (estocado em frasco âmbar)

6.2.11 Solução Iodeto de Potássio/Ácido Sulfúrico

Iodeto de potássio (1,31g), seco por uma noite sobre ácido sulfúrico concentrado, foi dissolvido em 600 mL de água deionizada. 350 mL de ácido sulfúrico concentrado foi adicionado lentamente sob agitação. A solução foi resfriada e diluída para 1L com água deionizada. Se houvesse formação de cristais de iodeto, uma nova solução deveria ser preparada.

6.2.12 Solução padrão de Brometo de Potássio

5 g de brometo de potássio foram dissolvidos e diluídos para 1L com água deionizada. Alíquotas de 8, 40, 80, 250 e 500 μ L da solução padrão de brometo de potássio 5g/L foram transferidas para tubos de borosilicato e completadas para 1mL com água deionizada.

6.2.13 Procedimento Analítico

Assim como as soluções padrão de brometo de sódio foram preparadas em tubos de borosilicato, uma massa de aproximadamente 50 mg do produto a se

analisado foi pesada diretamente no mesmo tipo de tubo usado para os padrões. Foi feito um branco com água deionizada.

Solução de iodeto de potássio (0,2 mL) foi adicionado a cada um dos tubos, que foram imediatamente colocados em gelo até que as amostras atingissem a temperatura do banho de gelo (30 a 45 minutos).

No tempo zero, 0,2 mL de solução gelada de permanganato de potássio 0,04M foi adicionado a cada tubo. A solução foi agitada por 15 segundos e colocada em banho de gelo imediatamente. A adição da solução de permanganato foi realizada em intervalos de 1 minuto para permitir um controle exato do tempo de reação para cada amostra individualmente.

Exatamente 10 minutos após a adição da solução de permanganato, as amostras foram retiradas do banho de gelo e 1 mL de tetracloreto de carbono foram imediatamente adicionados, obedecendo o tempo de reação de cada amostra.

Cada amostra foi agitada por 15 segundos e deixada em repouso para permitir a separação das fases. A fase inferior referente ao tetracloreto de carbono foi extraída com uma ponteira comprida e fina e lida em espectrofotômetro a 515 nm.

6.3 Resultados e Discussões

6.3.1 Hidrólise Ácida da Dextrana

10 mg de dextrana produzida foram dissolvidos em soluções de HCl de concentrações diferentes e submetidos a temperaturas diferentes com ou sem ação de ultrassom. A tabela 12 dispõe as condições de reações de hidrólise testadas.

Tabela 12. Experimentos de hidrólise de dextrana.

Experimento	HCl (M)	Temperatura (°C)	Ultrassom
1A	0,1	25	não
1B	0,01	25	não
1C	0,5	25	não
2A	0,1	80	não
2B	0,01	80	não
2C	0,5	80	não
3A	0,1	25	sim
3B	0,01	25	sim
3C	0,5	25	sim

Fonte: Dados do próprio autor.

Uma amostra do experimento 3B, hidrólise da dextrana à 25°C (menor temperatura testada), em HCl 0,01M (menor concentração testada), em ultrassom, reagido por 30 minutos, foi aplicada em placa de cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 35). Foi possível constatar a hidrólise de toda a dextrana em moléculas menores que a sacarose (utilizada como padrão), possivelmente o produto desta reação é a glicose.

A hidrólise em unidades de glicose não é o objetivo deste estudo, o interesse é a hidrólise da dextrana em oligossacarídeos, para otimizar o rendimento do composto desejado, ou seja, para que haja no produto final, o maior número de átomos de bromo ligados por grama de produto final, uma vez que o bromo se ligará apenas à última unidade de glicose da cadeia de dextrana, devido ao impedimento alostérico.

Já que as condições mais brandas de hidrólise testadas, com ultrassom, propiciou hidrólise exagerada da amostra de dextrana, as amostras relativas aos experimentos 3A e 3C, que foram realizadas com maior concentração de HCl, não foram aplicadas em cromatografia de camada delgada.

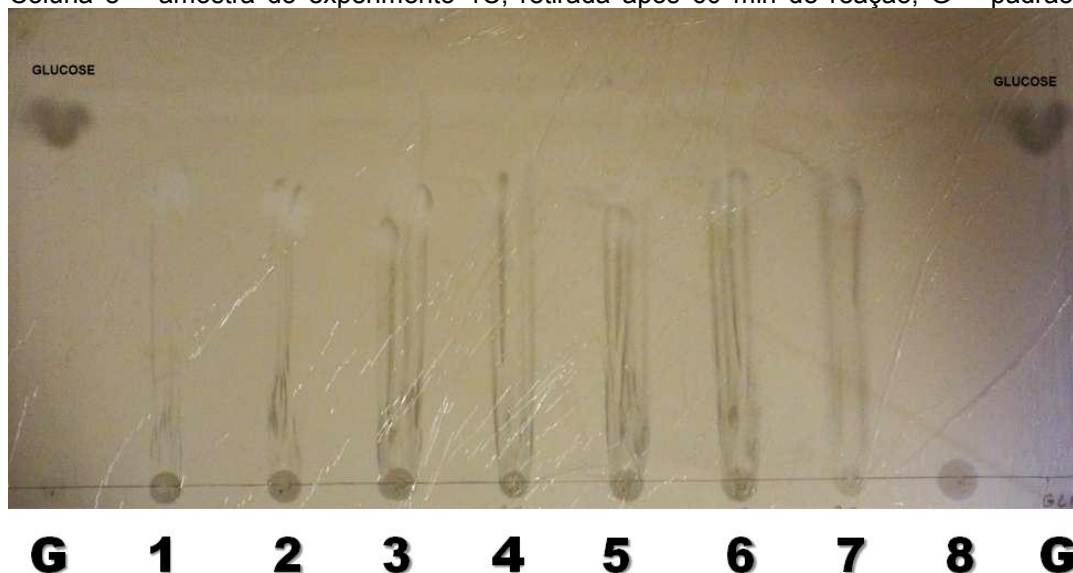
Figura 35. Análise em CCD de produto da hidrólise da dextrana FT045B com HCl em ultrassom (colunas: S = padrão de sacarose; 1 = amostra obtida no experimento 3B).



Fonte: Dados do próprio autor.

As amostras do experimento 2C apresentaram melhores resultados de hidrólise ao longo do tempo, podendo concluir que praticamente toda a dextrana do experimento 2C após 60 minutos de reação foi hidrolisada em oligossacarídeos e não em unidades de glicose, como obtido no experimento com ultrassom. Amostra retirada do experimento 1C, após 60 minutos de reação foi aplicada em CCD e mostrou que a temperatura de 25°C não é suficiente para que haja hidrólise da dextrana, nas concentrações de HCl testadas (Figura 36).

Figura 36: Análise em CCD dos produtos da hidrólise da dextrana FT045B com HCl. Coluna 1 – amostra do experimento 2C, retirada após 1 min de reação; Coluna 2 – amostra do experimento 2C, retirada após 5 min de reação; Coluna 3 – amostra do experimento 2C, retirada após 10 min de reação; Coluna 4 – amostra do experimento 2C, retirada após 15 min de reação; Coluna 5 – amostra do experimento 2C, retirada após 20 min de reação; Coluna 6 – amostra do experimento 2C, retirada após 30 min de reação; Coluna 7 – amostra do experimento 2C, retirada após 60 min de reação; Coluna 8 – amostra do experimento 1C, retirada após 60 min de reação; G = padrão de glicose.



Fonte: Dados do próprio autor.

6.3.2 Acetilação da dextrana

Alguns métodos foram reportados na literatura, quanto à esterificação de polissacarídeos, tais como cloreto de acetila com piridina (TERAMOTO; SHIBATA, 2006), anidrido acético com piridina e 4-(dimetilamino) piridina (LIEBERT; HUSSAIN; HEINZE, 2005; TEZUKA, 1998), ácidos carboxílicos ativados *in situ* com cloreto de tosila (HUSSAIN, 2008; LIEBERT et al., 2006; HEINZE et al., 2003), cloreto de iminium (HUSSAIN; LIEBERT; HEINZE, 2004a) e 1,1'-carbonildimidazol (HUSSAIN; HEINZE, 2008; HUSSAIN; 2008, HUSSAIN; LIEBERT; HEINZE, 2004B) e anidrido acético ativado com ácidos fortes ou metais catalíticos e anidrido acético catalisado por iodo (HUSSAIN, et al., 2010).

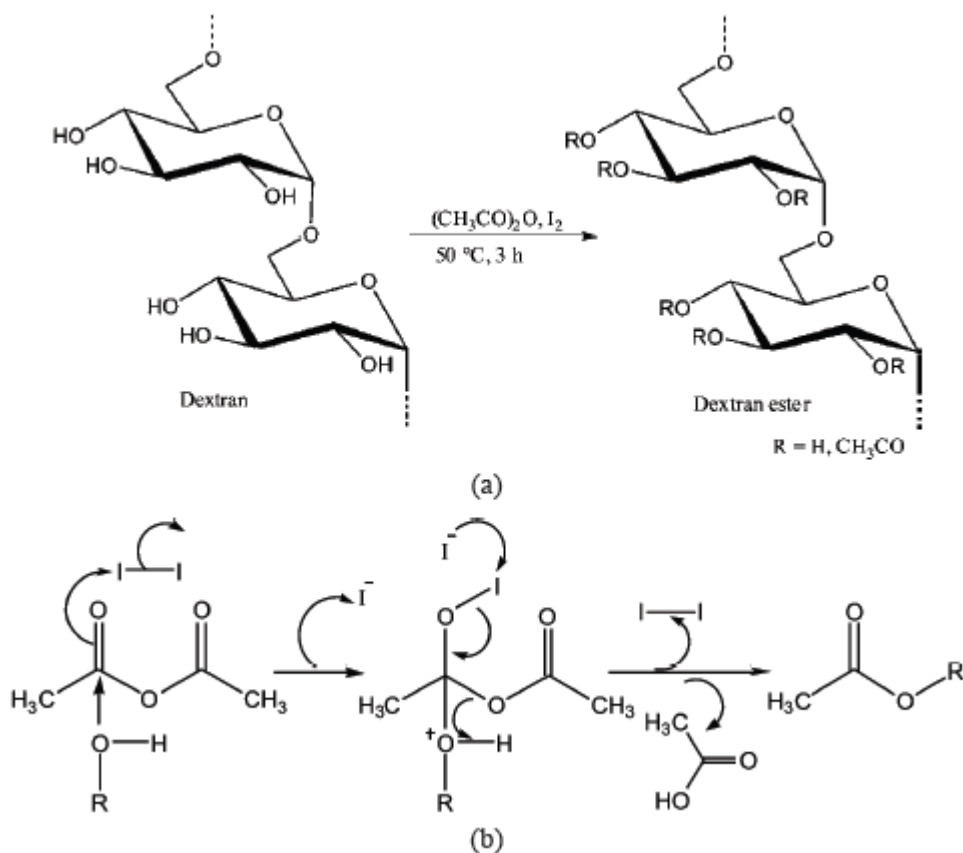
O procedimento descrito no projeto indicava o uso de ácido sulfúrico como catalisador, contudo a presença de ácido forte e aquecimento poderiam causar hidrólise descontrolada da dextrana, destruindo a estrutura do polissacarídeo.

Diante deste impasse, o ácido sulfúrico e mais dois outros reagentes (piridina e iodo) foram igualmente testados como catalisadores no processo de acetilação da dextrana.

6.3.3 Acetilação da dextrana, usando iodo como catalisador

O anidrido acético, na presença de iodo como catalisador, reage com álcoois. O mecanismo está delineado na Figura 37. O iodo ativa primeiramente o anidrido acético na presença de grupos alcoólicos, enquanto o oxigênio do R-OH ataca o grupo carbonílico resultando em hibridização sp^3 . O éster acético é formado pela reação do íon iodeto com o átomo de iodo que foi atacado pelo oxigênio do grupo carbonílico, resultando em iodo livre. Como sub-produto é formado o ácido acético.

Figura 37. 1.a) Acetilação da dextrana com anidrido acético catalisada com iodo, sem solvente e b) mecanismo geral para acetilação alcoólica da dextrana.



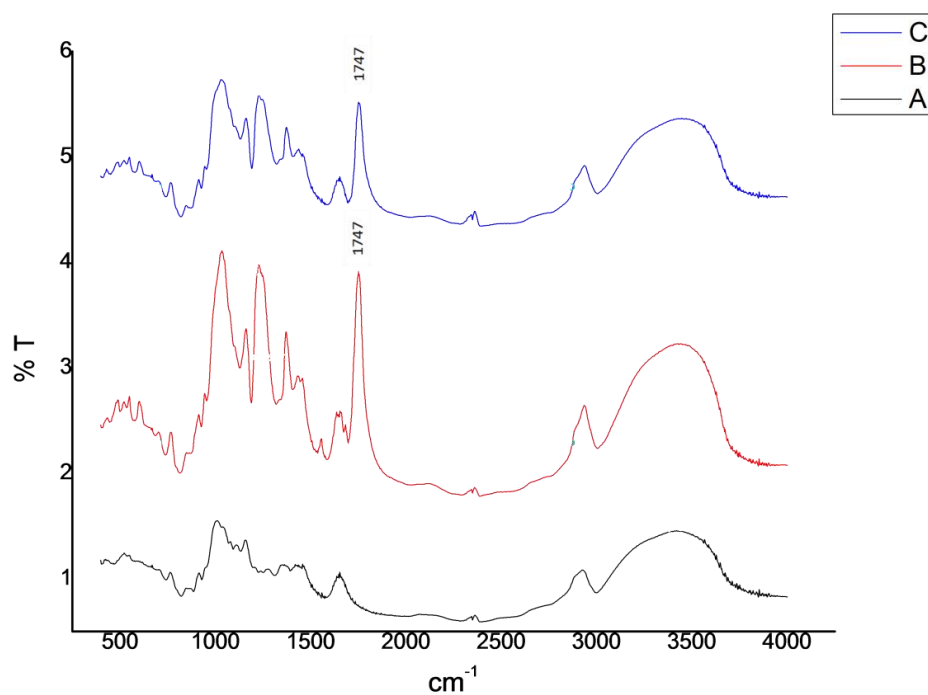
Fonte: Hussain, et al., (2010)

6.3.4 Análise por FTIR

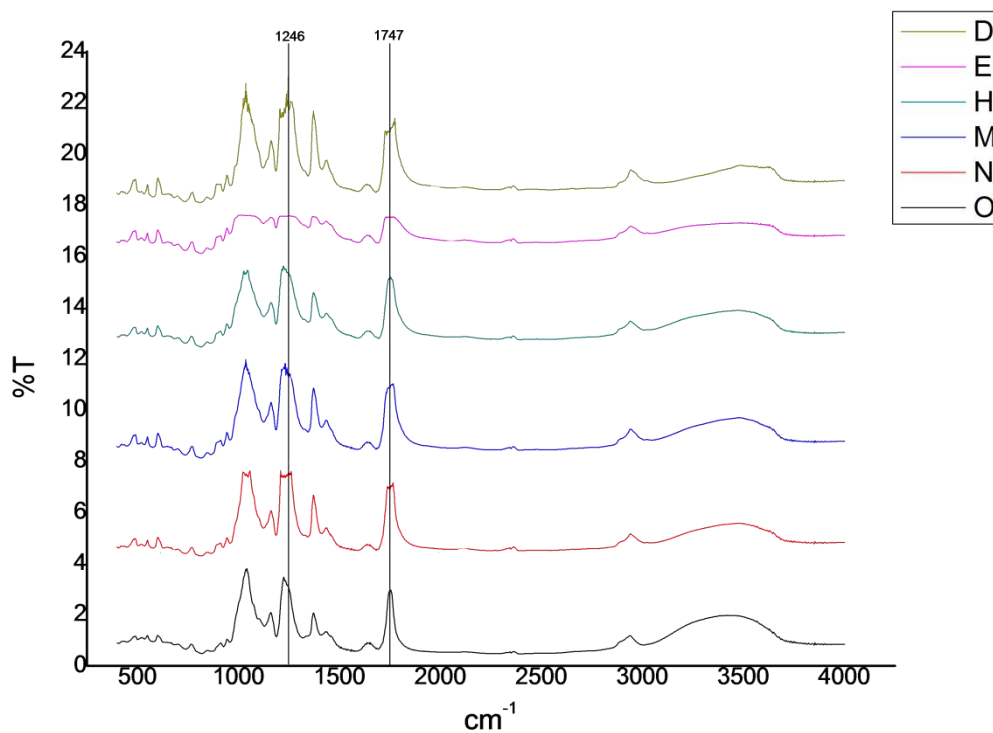
O produto da acetilação foi analisado por FTIR, usando a técnica de pastilhas de KBr para observar os picos de absorção de ésteres: C=O (1747 cm^{-1}); C-O-C (1246 cm^{-1}) e dos grupos hidroxilas (3500 cm^{-1}). A amostra A (dextrana pura) não apresentou o pico referente à absorção de ésteres (1747 cm^{-1}) e apresentou pico em 3500 cm^{-1} referente aos grupos hidroxilas. As amostras B e C, referentes à dextrana acetilada antes e depois da lavagem com acetona, respectivamente, apresentaram o pico referente à absorção de ésteres, contudo ainda apresentaram o pico de absorção dos grupos hidroxilas, mostrando que o grau de substituição das hidroxilas por grupos acetato não foi total, restando grupos hidroxilas remanescentes.

Como o objetivo do trabalho é fazer a ligação do brometo à dextrana, e o processo de acetilação é apenas um procedimento intermediário para que seja possível a ligação do bromo, e como sabemos que apenas o carbono anomérico da cadeia da dextrana será bromada, o fato de não ter havido acetilação completa da dextrana não é um fator que prejudica significativamente o resultado final esperado.

As demais amostras, que sofreram bromação, foram analisadas por IR, contudo a sobreposição dos picos impediu a confirmação da ligação C-Br, desta forma outros métodos foram utilizados para esta caracterização, contudo pode-se observar que as amostras D, E, H, M, N, O apresentaram mesmo perfil de espectro de FTIR, com os dois picos característicos da presença do grupo acetil (1747 cm^{-1} e 1246 cm^{-1}), assim como as amostras K, J, I. Embora a amostra J tenha sofrido desacetilação pela ação do MeOH, verifica-se que esta não foi completa, devido à presença dos picos referentes à presença do grupo éster na molécula, o que não ocorreu da mesma forma com as amostras L, G, F, que não apresentaram os picos 1747 cm^{-1} e 1246 cm^{-1} .

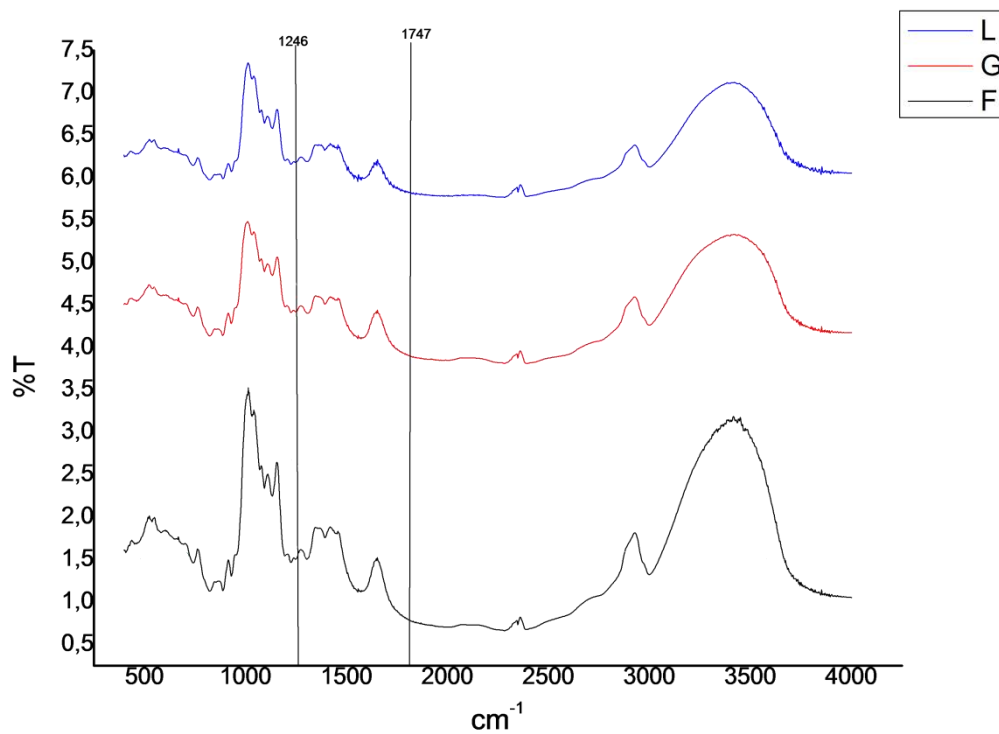
Figura 38. Espectro de FTIR-IR das amostras A, B e C.

Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 39. Espectro de FTIR-IR das amostras D, E, H, M, N e O.

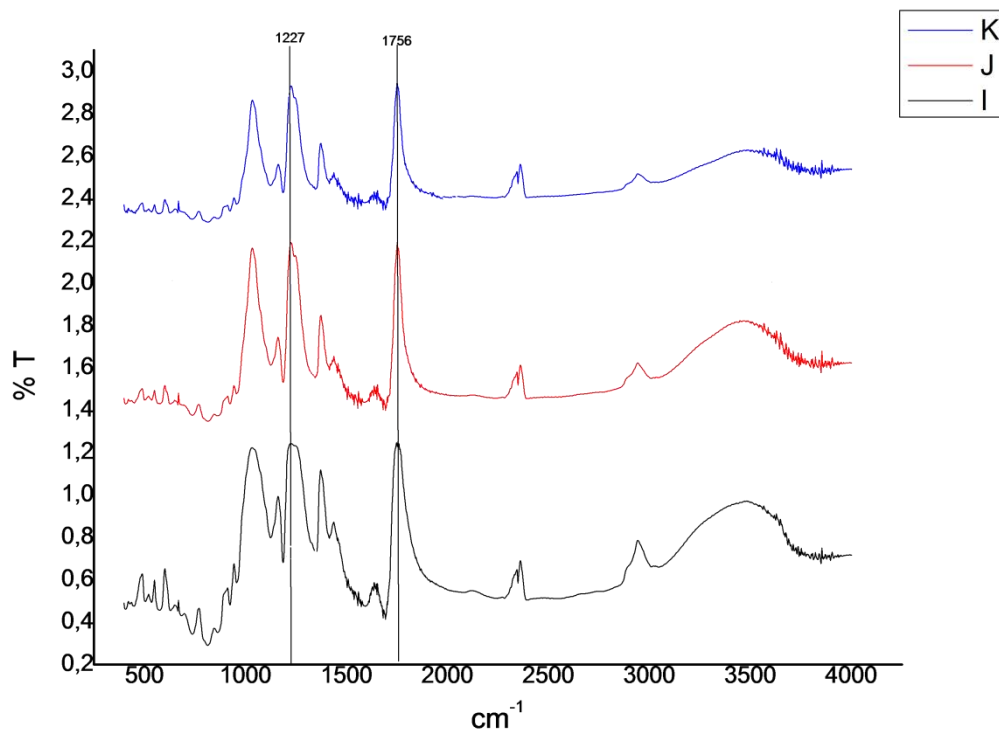
Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 40. Espectro de FTIR-IR das amostras L, G e F.



Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 41. Espectro de FTIR-IR das amostras K, J e I.



Fonte: Dados do próprio autor.

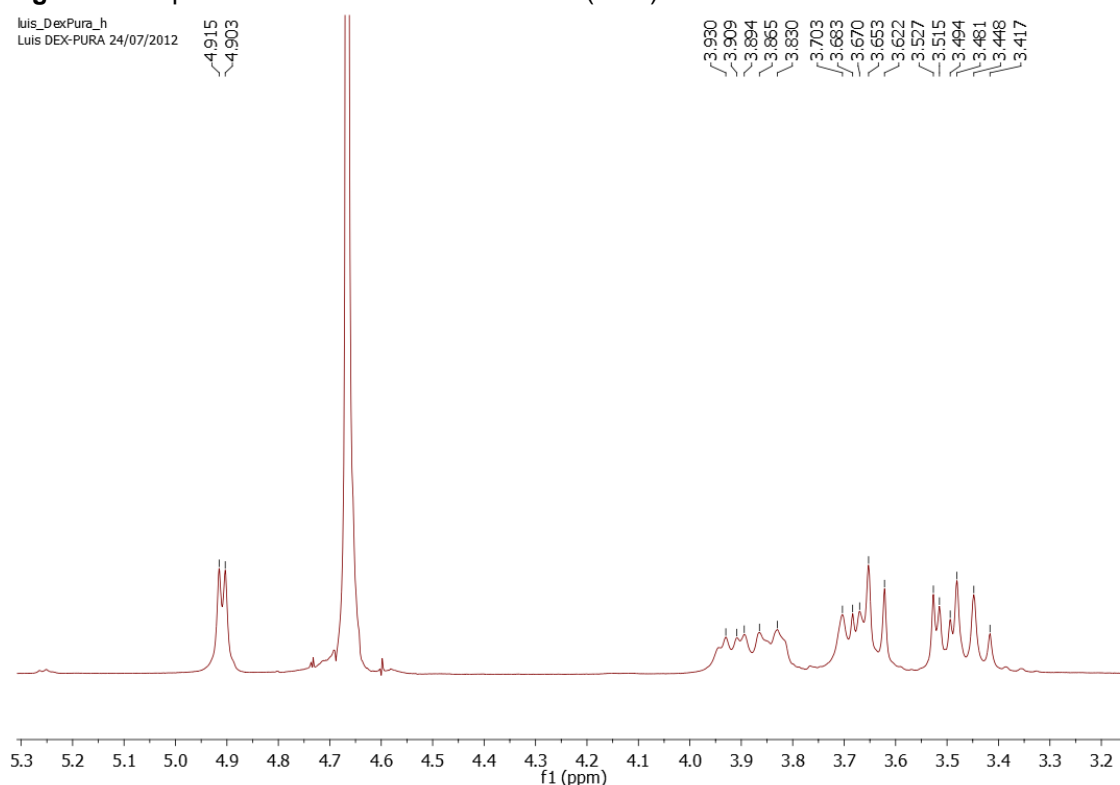
6.3.5 Bromação da dextrana acetilada

O termo “doadores glicosídicos” é usado para definir a metade glicosídica que contém um grupo abandonador na posição anomérica. Quando um doador glicosílico reage na presença de catalisador (também chamado de promotor) com uma hidroxila livre (chamada de acceptor glicosílico), será produzida uma ligação O-glicosídica. Os primeiros doadores glicosídicos desenvolvidos e usados especificamente para formação de glicosídios foram os haletos glicóis. (ARIAS, 2007)

Para que fosse possível a bromação da dextrana, foi necessária uma peracetilação inicial das unidades de glicose com anidrido acético na presença de um catalisador (neste caso testou-se a piridina, o ácido sulfúrico e o iodo), por 4h a 50°C, sob refluxo.

O tratamento da glicose acetilada (1, 2, 3, 4, 6 – Pentaacetil- α , β – D- glucopirabosideo) com solução 33% de HBr em ácido acético a 5°C por 12h, gerou o composto acetobromoglucose, que foi cristalizado com éter isopropílico.

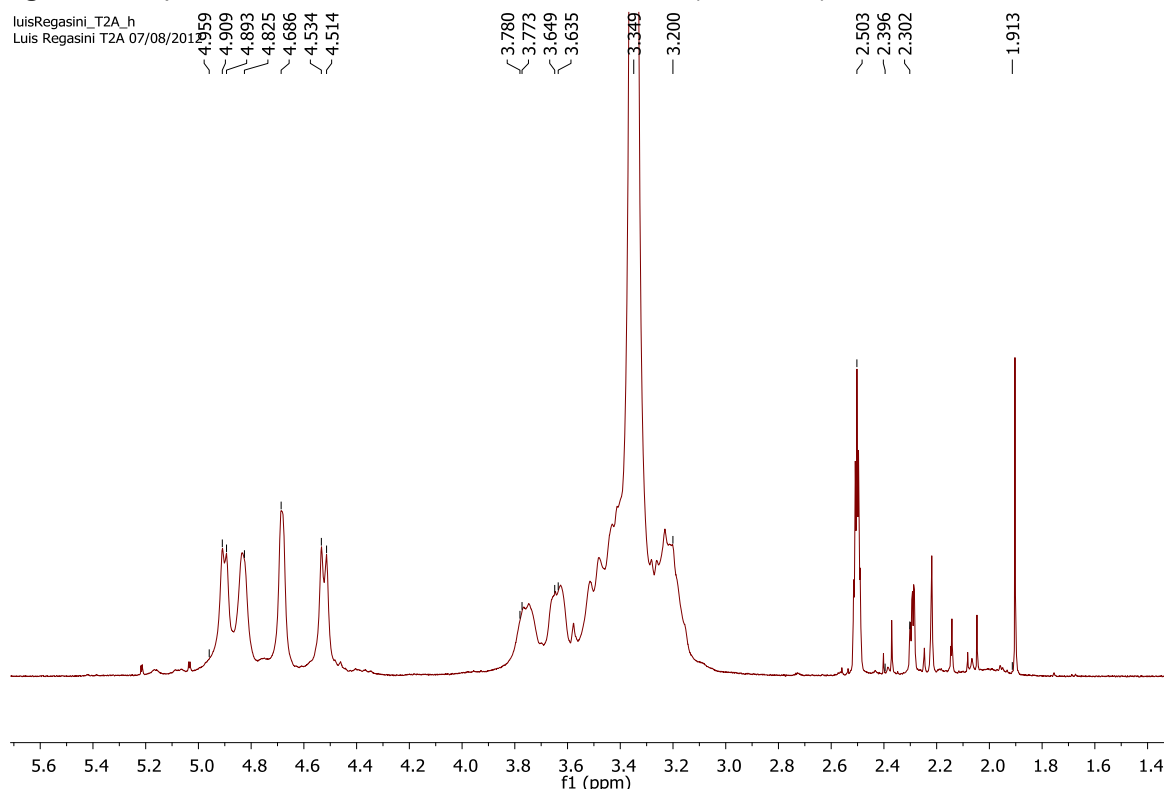
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H da dextrana (D $_2\text{O}$)



Fonte: Dados do próprio autor.

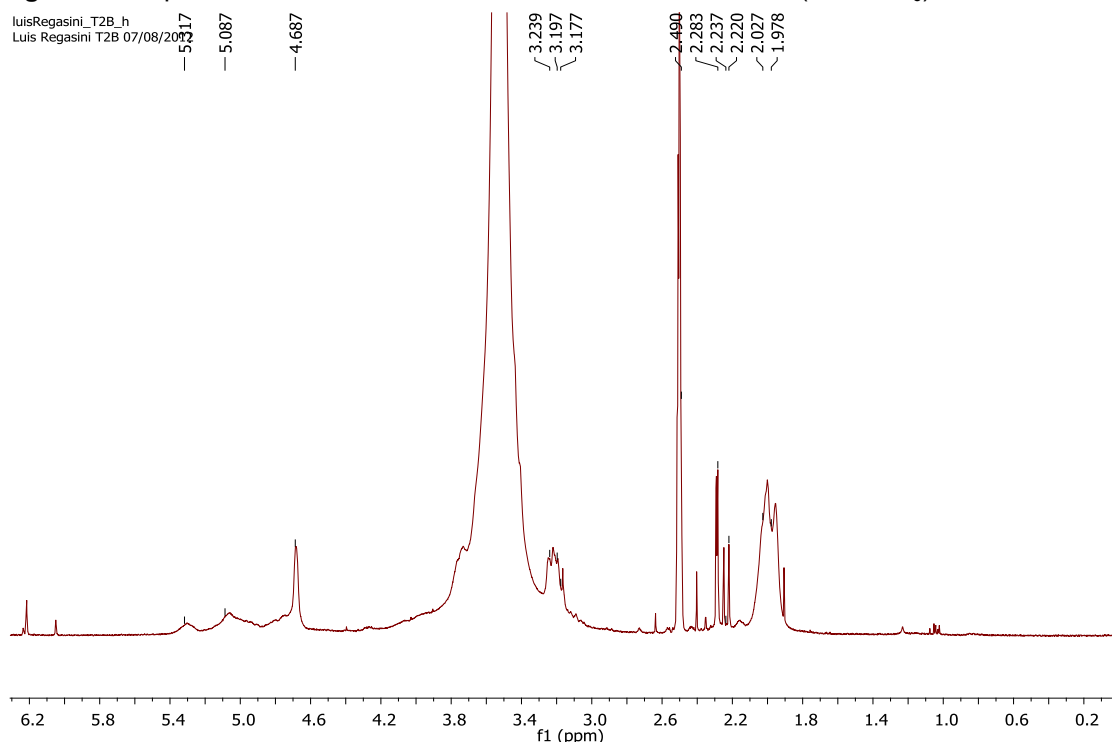
A confirmação da acilação (acetilação), tendo iodo como catalisador, pode ser realizada pela observação de uma série de singletos presentes entre δ_H 2,00 e 2,40, os quais podem ser atribuídos aos hidrogênios metílicos dos grupos acetoxilas (Figura 43).

Figura 43. Espectro de RMN de 1H da dextrana acetilada (DMSO- d_6)



Fonte: Dados do próprio autor.

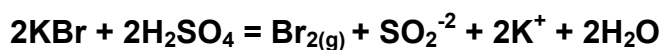
A reação de bromação parcial da dextrana acetilada na posição 1 pode ser confirmada pela observação do sinal em δ_H 6,20, aproximadamente, o qual pode ser atribuído ao hidrogênio anomérico o qual teve uma hidroxila substituída por um átomo de bromo. Esse valor de deslocamento químico demonstra-se muito similar ao observado para acetobromoglicose (ARIAS, 2007). Contudo, salienta-se que uma quantidade significativa de acetoxilas podem ser observadas neste segundo produto devido os sinais compreendidos entre δ_H 2,00 e δ_H 2,40.

Figura 44. Espectro de RMN de ^1H da dextrana acetilada bromada ($\text{DMSO}-d_6$)

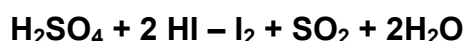
Fonte: Dados do próprio autor.

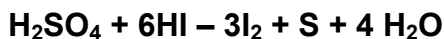
6.3.6 Análise qualitativa quanto à presença de bromo ligado à dextrana.

O contato do ácido sulfúrico concentrado com compostos sólidos, que na mistura contenham íons brometo, desprende vapores de bromo alaranjados a marrom.



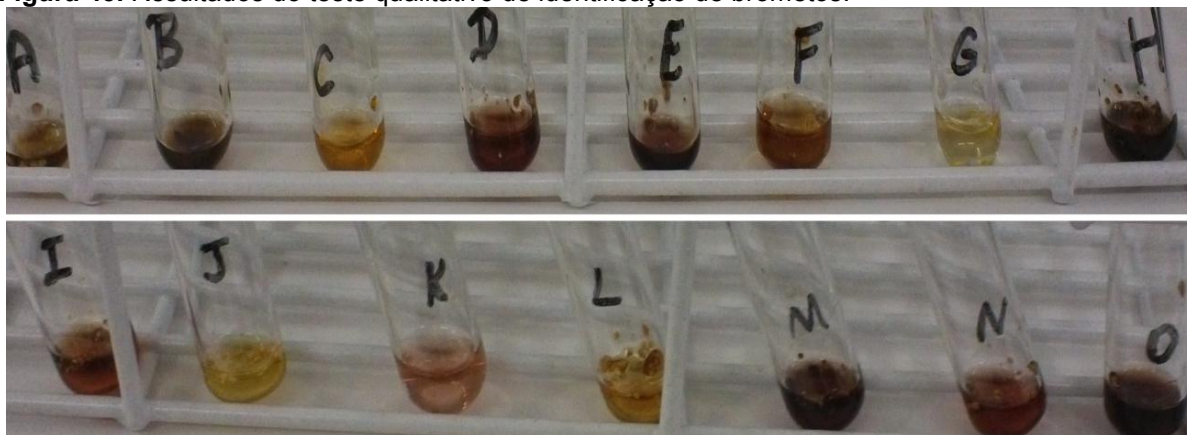
Como as amostras analisadas tiveram contato com iodo durante a acetilação, é importante observar se há desprendimento de vapores da cor violeta. Há formação de HI, mas a maioria do HI reduz o ácido sulfúrico a SO_2 , H_2S e enxofre (KAPOOR; JOHAR, 1989).





A Figura 45 mostra os resultados obtidos após a adição de ácido sulfúrico às amostras.

Figura 45. Resultados do teste qualitativo de identificação de brometos.



Fonte: Dados do próprio autor.

Inicialmente, observa-se que a amostra B apresenta coloração marrom, desprendendo vapores violeta. Isto pode ser explicado pela presença de iodo, que foi adicionado como catalisador na reação de acetilação. A ausência de íons brometos na amostra B pôde ser comprovada pela análise quantitativa que apresentou 0% de brometos na amostra. A amostra A é composta de dextrana hidrolisada, que é bastante susceptível à ação do ácido sulfúrico concentrado, sofre hidrólise e por isto há formação de coloração marrom (0% de brometo pela análise quantitativa).

A amostra C refere-se à dextrana acetilada após lavagem do iodo com acetona e por isto apresenta coloração mais clara que a amostra B, contudo ainda existe hidrólise da dextrana, apesar dos grupos acetílicos terem substituído algumas hidroxilas das unidades de glicose, a dextrana ainda continua susceptível à hidrólise por ação do ácido sulfúrico concentrado, o que explica a coloração levemente alaranjada. 0% de brometo foi detectado pela análise quantitativa, comprovando a eficiência do procedimento de lavagem com acetona.

Não é possível confiar nos resultados quantitativos de brometo nas amostras analisadas sem lavagem do iodo com acetona, pois a coloração do próprio iodo falseou as leituras no espectrofotômetro.

A análise qualitativa mostrou que as amostras sem lavagem com acetona, apresentaram coloração marrom, referente à detecção de brometos, mais clara que seus respectivos pares, que foram lavados com acetona. Podemos concluir, portanto que a lavagem com acetona, torna a bromação mais eficiente.

As amostras que sofreram desacetilação apresentaram coloração mais fraca e porcentagem de brometos menores que as amostras analisadas antes da desacetilação. Isto mostra que a desacetilação não é viável para o processo de bromação.

Não podemos comparar as amostras D e M, devido ao excesso de HBr da amostra D, por não ter sido lavada, contudo ao compararmos as amostras O e N, que são referentes à amostragem após a lavagem com etanol, podemos concluir que a cristalização com éter isopropílico não deve ser empregada, pois diminui a porcentagem de bromação. A lavagem com etanol é necessária pois retira o excesso de HBr, deixando a amostra mais pura.

6.4 Conclusão

O composto, Bromo-dextrana, foi sintetizado pela reação de acetilação da dextrana com anidrido acético, catalisada com iodo, seguida de purificação com acetona e bromação com ácido bromídrico.

7. REFERÊNCIAS

- AGA, H. et al. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. **Agric Biol Chem**, v. 55, p. 1751–1756, 1991.
- AGA, H; YONEYAMA, M; SAKAI, S. *Process for preparing high alphasglycosyl- L-ascorbic acid, and separation system for the process*. . [S.l: s.n.], 1994.
- AHMED, F. *2,3-aziridino ribofuranosyl donors in glycoside bond sythesis*. Edmonton, Alberta: [s.n.], 2013. p. 21–23
- ALIU, Y O; CHINEME, C N. Isometamidium-dextran complex: toxicity and activity against *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* in rats and mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 53, n. 2, p. 196–203, 1980.
- AL-NOORI, S; PIERSON, M G; SWAN, J W. Bases celulares das epilepsias. In: DA COSTA, J C et al. (Org.). **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos**. São Paulo: Editora Lemos, 1998. p. 33–137.
- ARIAS, M A B. **Synthesis and characterization of glycosides**. New York: Springer, 2007. p. 38–41.
- ASENJO, J A. Separation process. Selection of operation process. In: ASENJO, J A (Org.). **Separation ProCess in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 3–16.
- ASPINALL, G O. Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. (Org.). **The Polysaccharides**. New York: [s.n.], 1982. p. 35–131.
- AVANZINI, G; FRANCESCHETTI, S. Cellular biology of epileptogenesis. **Lancet Neurol**, v. 2, n. 1, p. 33–42, 2003.
- BABU, K; SATYANARAYANA, T. α -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. **BioChem Process**, v. 30, 1995.
- BERENDT, M. Epilepsy in the dog and cat: clinical presentation, diagnosis, and therapy. **The European Journal of Caompanion Animal Practice**, v. 18, n. 1, p. 37–45, 2008.
- BERENDT, M et al. Premature death, risk factors, and life patterns in dogs with epilepsy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 754–749, 2007.
- BERENDT, M; GREDAL, H; ALVING, J. Characteristics and phenomenology of epileptic parcial seizures in dogs: similarities with human seizure seminology. **Epilepsy Res**, v. 61, n. 167-173, 2004.

BERTRAND, A et al. *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents. **Carbohydr Res**, v. 341, p. 855–863, 2006.

BIOSCIENCES, Amerham. Gel Filtration. **Principles and Methods (18-1022-18)**. Ai ed. [S.l: s.n.], [S.d.].

BIOSCIENCES, Amerham. Sephacryl S-200 High Resolution Instructions. *TK I Uppsala AB*, 1998.

BOENIGK, H E; LORENZ, J H; JURGENS, U. Bromides - Today still useful as antiepileptic substances? **Nervenarzt**, v. 56, n. 10, p. 579–582, 1985.

BRADFORD, M M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal BioChem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BROWN, T L; YET, M G; WOLD, F. Substrate-containing gel electrophoresis: sensitive detection of amylolytic, nucleolytic, and proteolytic enzymes. **Anal BioChem**, v. 122, n. 1, p. 164–172, 1982.

BUCHHOLZ, K; MONSAN, P. **Dextransucrases**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 589–603

CARLESSO, Fernanda Noal. **Ação do brometo de sódio na atividade epileptiforme não-sináptica**. 2008. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Faculdade de Medicina, 2008.

CARNEY, M W. Five cases of bromism. **Lancet**, v. 2, p. 523–524, 1971.

CELANESE. **Acetic Anhydride**: Material Safety Data Sheet (PDF). . [S.l: s.n.], 2012

CHANDLER, K. Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders? **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 207–217, 2006.

CHEN, D L et al. Heterologous expression and biochemical characterization of α -glucosidase from *Aspergillus niger* by *Pichia pastoris*. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 4819–4824, 2010.

CHEN, J et al. High-level extracellular production of α -cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). **J Agric Food Chem**, v. 59, p. 3797–3802, 2011.

CHIU, A; KIMBALL, A B. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. **Br J dermatol**, v. 149, n. 4, p. 681–691, 2003.

CHRISMAN, C et al. Crisis. In: GIADOMENICO, N (Org.). **Manual de neurologia práctica**. 1a.ed. ed. Barcelona: Multimédica, 2003. p. 84–111.

CHRISTENSEN, C C. Dossiê emulsificantes. **Food Ingredients Brasil**, *www.revista-fi.com*, v. 7, p. 68–74, 2009.

COCHRANE, S M. Update on seizures in the dog and cat. 2007, Sydney, Australia: [s.n.], 2007. p. 19–23. Disponível em: <http://ivis.org/proceedings/wsava/2007/pdf/84_20070520165138_abs.pdf>.

COHEN, E; ZILKHA, A. Anionic graft polymerization of methyl methacrylate on starch and dextrin. *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer chemistry*, v. 7, p. 1881–1892, 2003.

COHEN, H J. *The use of diaminobenzidine for spectrophotometric and acrylamide gel detection of sulfite oxidase and its applicability to hydrogen peroxide-generating enzymes.* **Anal BioChem**, v. 53, p. 208, 1973.

CÔTÈ, G L; ROBYT, J F. Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes alternating 1-6, 1-3- α -D-glucan. **Carbohydrate research**, v. 101, p. 57–74, 1982.

CRAIG, I. A procedure for the analysis of citrate synthase (E.C.. 4.1.3.7) in somatic cell hybrids. **BioChem Genet**, v. 9, p. 351, 1973.

CRAIG, I; TOLLEY, E; BORROW, M. **Birth defects: original article series.** New York: The National Fpundation, March of Dimes, 1976. p. 114, vol. 12

DAVIDSON, J M et al. Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. **J Biol Chem**, v. 272, n. 1, p. 345–2, 1997.

DAY, D F; KIM, D. A Novel Process for the Production of Dextrans of Selected Molecular Sizes. **Ann NY Acad Sci**, v. 672, p. 573–576, 1992.

DEUTSCHER, M P. Guide to protein purification. **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1990.

DIENER, W. **Das alteste antiepileptikum: kaliumbromid.** Offenburg, Germany: [s.n.], 1997.

DIENER, W; SORNI, M; RUILE, S. Panniculitis due to potassium bromide. **Brain Dev**, v. 20, p. 83–87, 1998.

DOLS, M et al. Characterization of the different dextranasucrase activities excreted in glucose, fructose or sucrose medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, p. 1298–1302, 1998.

DOLS, M et al. Kinetic modeling of oligosaccharide synthesis catalyzed by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextransucrase. **Biotechnology and bioengineering**, v. 63, p. 308–315, 1999.

DOLS, M et al. Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesised by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextranase. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 549–559, 1997.

DRESSER, G K et al. High-level extracellular production of α -cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). **Clin Pharmacol Ther**, v. 72, p. 247–255, 2002.

DREYER, R. Die pharmakotherapie der epilepsien. **Springer Verlag**, p. 714–718, 1972.

EBERT, K H; SCHENK, G. Mechanisms of biopolymer growth: the formation of dextran and levan. **Adv Enzymol**, v. 30, p. 179–219, 1968.

ENGLARD, S; SEIFTER, S. The biochemical functions of ascorbic acid. **Annu Rev Nutr**, v. 6, p. 365–406, 1986.

ERNST, J P; DOOSE, H; BAIER, W K. Bromides were effective in intractable epilepsy with generalized tonic-clonic seizures and onset in early childhood. **Brain Dev**, v. 10, n. 6, p. 385–388, 1988.

FAIRBANKS, A J; SEWARD, C M P. Sythesis and Activation of Glycosyl Donors III: Acetimidates, n-Pentenyl and Vinyl Glycosides. In: OSBORN, H. M. I. (Org.). **Carbohydrates**. [S.l.]: Academic Press, 2003. p. 147–194.

FALCONER, D J; MUKERJEA, R; ROBYT, J F. Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentration of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextranase, the sucrose concentration, and the temperature. **Carbohydr Res**, v. 346, p. 280–284, 2011.

FIGURES, W R; EDWARDS, J R. Alfa-D-glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* isolation of two forms of the enzyme that bind to insoluble dextran. **Carbohydrate research**, v. 88, p. 107–117, 1981.

FISHMAN, M J; SKOUGSTAD, M W. Indirect spectrophotometric determination of traces of bromide in water. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 146–149, 1963.

FOX, J D; ROBYT, J F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. **Anal BioChem**, v. 195, p. 93–96, 1991.

FRANCES, J E. Pediatric epilepsy models. **Epilepsy Res**, v. 68, p. 19–94, 2006.

FRIEDLANDER, W J. The rise and fall of bromide therapy in epilepsy. **Arch Neurol**, v. 57, p. 1782–1785, 2000.

FU, D T; ROBYT, J F. "Acceptor reactions" of maltodextrins with *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranase. **Arch BioChem Biophys**, v. 283, p. 379–387, 1990.

FUJINAMI, Y; TAI, A; YAMAMOTO, I. Radical scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl of ascorbic acid 2-glucoside (AA-2G) and 6-acyl-AA-2G. **Chem Pharm Bull**, v. 49, p. 642–644, 2001.

GAWANDE, B et al. Optimization of cyclomaltoextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus*. **Enzyme Microb Technol**, v. 22, p. 288–291, 1998.

GÓMES DE SEGURA, A et al. Synthesis of Dextran Using Dextranases. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 42, p. 337–342, 2004.

GOULAS, A K et al. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextranase and dextranase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 327–338, 2004.

GOYAL, A; KATIYAR, S S. Fractionation of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextran sucrose by polyethylene glycol: a simple and effective method of purification. **J Microbiol Methods**, v. 20, p. 225–231, 1994.

GUERRERIRO, A M et al. Considerações Gerais. **Epilepsia**. [S.l: s.n.], 2000. p. 419.

HAMELIK, R M; MCCABE, M M. An endodextranase inhibitor from batch cultures of *Streptococcus mutans*. **BioChem Biophys Res Commun**, v. 106, p. 875–880, 1982.

HAN, R et al. Functions, applications and production of 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 95, p. 313–320, 2012.

HEINZE, T H et al. Unconventional cellulose esters: synthesis, characterization and structure-property relations. **Cellulose**, v. 10, p. 283–296, 2003.

HOLT, S M; AL-SHEIKH, H; SHIN, K J. Characterization of dextran-producing *Leuconostoc strains*. **Letters in applied microbiology**, v. 32, n. 3, p. 185–189, 2001.

HSIEH, H J; NAIR, G R; WU, W T. Production of ascorbyl palmitate by surfactant-coated lipase in organic media. **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 5777–5781, 2006.

HURWITZ, E; WILCHEK, M; PITHA, J. Soluble macromolecules as carriers for daunorubicin. **J Appl BioChem**, v. 2, p. 25–35, 1980.

HUSSAIN, M et al. An efficient acetylation of dextran using in situ activated acetic anhydride with iodine. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 75, n. 2, p. 165–173, 2010. Disponível em: <<http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0352-51391002165H>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

HUSSAIN, M A. Unconventional Synthesis and Characterization of Novel Abietic Acid Esters of Hydroxypropylcellulose as Potential Macromolecular Prodrugs. **J Polym Sci A: Polym Chem**, v. 46, n. 2, p. 747–752, 2008.

HUSSAIN, M A; HEINZE, T H. Unconventional Synthesis of *Pullulan abietates*. **Polym Bull**, v. 60, n. 6, p. 775–783, 2008.

HUSSAIN, M A; LIEBERT, T F; HEINZE, T H. Acylation of Cellulose with N,N'-Carbonyldiimidazole-Activated Acids in the Novel Solvent Dimethyl Sulfoxide/Tetrabutylammonium Fluoride. **Macromol Rapid Commun**, v. 25, p. 916–920, 2004a.

HUSSAIN, M A; LIEBERT, T F; HEINZE, T H. First Report on a New esterification method for cellulose. **Polym News**, v. 29, n. 1, p. 14–17, 2004b.

JACOB, R A; SOTOUDEH, G. Vitamin C function and status in chronic disease. **Nutr Clin Care**, v. 5, p. 66–74, 2002.

JAMUNA, R et al. Synthesis of cyclodextrin glucosyl transferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. **Appl BioChem Biotechnol**, v. 43, p. 163–176, 1993.

JANE, J -L; ROBYT, J F. Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amylopectins. **Carbohydrate Research**, v. 132, p. 105–118, 1984.

JEANES, A et al. Characterization and classification of dextrans from ninety six strains of bacteria. *Journal of The American Chemical Society*, v. 76, p. 5041–5052, 1954.

JEANES, A. Preparation of dextrans from growing *Leuconostoc cultures*. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 118–126, 1965.

JOYNT, R J. The use of bromides for epilepsy. **Am J Dis Child**, v. 128, n. 3, p. 362–363, 1974.

JUN, H K; BAE, K M; KIM, S K. Production of 2-O-alpha-D-glucopyranosyl L-ascorbic acid using cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus* sp. **Biotechnol Lett**, v. 23, p. 193–1797, 2001.

KAAGITANI-SHIMONO, K et al. Epilepsy in Wolf-Hirschhorn syndrome. **Epilepsia**, v. 46, n. 1, p. 150–155, 2005.

KABOLI, H; REILLY, P. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. **Carbohydr Res**, v. 22, p. 1055–1069, 1980.

KAGITANI-SHIMONO, K et al. Kagitani-Shimono, k Imai, K Otani, K Kamio, N Okinaga, T Toribe, Y et al. **Epilepsy in Wolf-Hirschhorn syndrome**, v. 46, n. 1, p. 150–5, 2005.

KAPOOR, K L; JOHAR, G S. **Systematic Qualitative Analysis**. 1. ed. New Delhi: Discovery Publishing House, 1989. p. 17

KARTHA, K P R; FIELD, R A. Synthesis and Activation of Carbohydrate Donors: Thioglycosides and Sulfoxides. In: OSBORN, H. M. I. (Org.). **Carbohydrates**. [S.I.]: Academic Press, 2003. p. 121–145.

KIKUCHI, S et al. Decreased distribution of gentamicin in rat kidney by complexation with dextran sulfate. **Int J Pharm**, v. 42, p. 193–198, 1988.

KIM, D et al. Dextran molecular size and degree of branching as function of sucrose concentration pH and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMCM. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1183–1189, 2003.

KIM, D; DAY, D F. A new process for the production of clinical dextran by mixed-culture fermentation of *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 844–848, 1994.

KIM, D; KIM, Dw. Facile purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 219–222, 1999. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=1805989>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

KIM, D; ROBYT, J F. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 8, p. 659–664, 1994a.

KIM, D; ROBYT, J F. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextransucrase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 12, p. 1010–1015, 1994b.

KIM, Ym et al. Construction of a fusion enzyme of dextransucrase and dextranase: Application for one-step synthesis of isomalto-oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 159–164, 2009.

KIM, Ym et al. Purification and characterization of a novel glucansucrase from *Leuconostoc lactis* EG001. **Microbiological research**, v. 165, p. 384–391, 2010.

KINASHHI, Y et al. Ascorbic acid 2-glucoside reduces micronucleus induction in distant splenic T lymphocytes following head irradiation. **Mutat Res**, v. 695, p. 69–74, 2010.

KIRBY, R. **Status epilepticus**. 2008, Rimini, Itália: [s.n.], 2008. p. 294–295.

KITAOKA, M; ROBYT, J F. Large-scale preparation of highly purified dextransucrase from a high-producing constitutive mutant of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 6, p. 386–391, nov. 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014102299800060X>>.

KOBAYASHI, M; MATSUDA, K. Characterization of multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Biochimica et biophysica acta**, v. 614, p. 46–62, 1980.

KOBAYASHI, M; MATSUDA, K. Purification and properties of the extracellular dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. **Journal of Biochemistry**, v. 79, p. 1301–1308, 1976.

KOBS, S F et al. Affinity purification of dextransucrase from *Streptococcus sanguis* ATCC 10558. **Carbohydrate Research**, v. 203, n. 1, p. 156–161, 1990.

KOEPSELL, H J et al. Enzymatic synthesis of dextran. **J. Biol. Chem.**, v. 200, p. 793–801, 1952.

KORINTHENBERG, R et al. Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. **J Child Neurol**, v. 22, n. 4, p. 414–418, 2007.

KOUKI, M et al. Comparison of ascorbic acid and ascorbic acid 2-O-[alpha]-glucoside on the cytotoxicity and bioavailability to low density cultures of fibroblasts. **BioChem Pharmacol**, v. 44, p. 2191–2197, 1992.

KUBOTA, M et al. **α - Isomaltosylglucosaccharide synthase**, *Process for producing the same and use thereof*. . [S.l: s.n.]. , 2007

KUMANO, Y; SAKAMOTO, T; EGAWA, M; TANAKA, M; et al. Enhancing effect of 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid, a stable ascorbic acid derivatives, on collagen synthesis. **Biol Pharm Bull**, v. 21, p. 662–666, 1998.

KUMANO, Y; SAKAMOTO, T; EGAWA, M; IWAI, I; et al. In vitro and in vivo prolonged biological activities of novel vitamin C derivative, 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G), in cosmetic fields. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 44, p. 345–359, 1998.

KWON, T; KIM, C T; LEE, J H. Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2-glucoside by a recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium longum*. **Biotechnol Lett**, v. 29, p. 611–615, 2007.

LAEMMLI, U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEE, S B et al. Antioxidative effects of glycosyl-ascorbic acids synthesized by maltogenic amylase to reduce lipid oxidation and volatiles production in cooked chicken meat. **Biosci Biotechnol BioChem**, v. 68, p. 36–43, 2004.

LETTER, Gastaut H. Epileptic seizures. **Dev Med Child Neurol**, v. 15, n. 5, p. 688–9, 1973.

LEVY, H R; MATTSON, H R; MELDRUM, S B. Other antiepileptic drugs. In: FRITZ, E D (Org.). **Antiepileptic Drugs**. New York: Raven Press, 1995. p. 949–951.

LI, H; SHI, L. **Ascorbic acid derivatives, their preparation methods, intermediates and uses in cosmetics**. . [S.l: s.n.]. , 2007

LI, Z et al. Extracellular expression and biochemical characterization of alpha-cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*. **Carbohydr Res**, v. 345, p. 886–892, 2010.

LIEBERT, T F et al. Synthesis and Characterization of Cellulose α -Lipoates: A Novel Material for Adsorption onto Gold. **Polym Bull**, v. 57, p. 857–863, 2006.

LIEBERT, T F; HUSSAIN, M A; HEINZE, T H. Structure Determination of Cellulose Esters via Subsequent Functionalization and NMR Spectroscopy. **Macromol Symp**, v. 223, p. 79–91, 2005.

LIVINGSTON, S; PEARSON, P H. Bromides in the treatment of epilepsy in children. **Am J Dis Child**, v. 86, p. 717–725, 1953.

LU, P W et al. Synthesis of the 2-methyl ether of L-ascorbic acid: stability, vitamin activity, and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum compared to those of the 1- and 3-methyl ethers. **J Agric Food Chem**, v. 32, p. 21–28, 1984.

LUPO, M P. Antioxidants and vitamins in cosmetics. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 467–473, 2001.

MAJUMDER, A; KIRAN, R; PURAMA, A. An overview of purification methods of glycoside hydrolase family 70 dextranase. **Indian J Microbiol**, v. 47, p. 197–206, 2007.

MANDAI, T; YONEYANMA, M; SAKAI, S. **The crystal structure and physicochemical properties of L-ascorbic acid 2-glucoside**. [S.l: s.n.], 1993

MARSHALL, J J. Manipulation of the properties of enzymes by covalent attachment of carbohydrate. **Trends BioChem Sci**, v. 3, p. 79–83, 1978.

MARTIN, R B. **Introduction to Biophysical Chemistry**. New York: McGraw-Hill, 1964. p. 98–102

MCNAMARA, J O. Cellular and Molecular Basis of Epilepsy. **The journal of Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 3413–3425, 1994.

MEAD, C G; FINAMORE, F J. The occurrence of ascorbic acid sulfate in the brine shrimp, *Artemia salina*. **Biochem**, v. 8, p. 2652–2655, 1969.

MEHVAR, R. Recent trends in the use of polysaccharides for improved delivery of therapeutic agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 4, p. 283–302, 2003.

MEIERKORD, H et al. Sodium bromide: effects on different patterns of epileptiform activity, extracellular pH changes and GABAergic inhibition. **Naunyn Schiedeborgs Arch Pharmacol**, v. 361, n. 1, p. 25–32, 2000.

MEMMI, A et al. A highly efficient, solvent-free and energy-effective method of cellulose acetylation. **E-Polymers**, v. 83, p. 401, 2005.

MEULENBELD, G H et al. Enhanced (+)-catechin transglucosylating activity of *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase due to fructose removal. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, p. 4141–4147, 1999.

MIKHAIL, J W; MANSOUR, N S. Leishmania donovani: Therapeutic and prophylactic action of antimony dextran glycoside (RL-712) in the golden hamster. **Experimental Parasitology**, v. 37, n. 3, p. 348–352, 1975.

MILLER, A W; EKLUND, S H; ROBYT, J F. Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydrate Research**, v. 147, p. 133119–, 1986.

MILLER, A W; ROBYT, J F. Stabilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by nonionic detergents, poly(ethylene glycol) and high molecular weight dextran. **Biochimica et biophysica acta**, v. 785, p. 89–96, 1984.

MIMA, H et al. Chemistry and application of ascorbic acid phosphate. **Vitamin**, v. 41, p. 387, 1970.

MIYAI, E; YANAGIDA, M; et al. Ascorbic acid 2-O- α -glucoside, a stable form of ascorbic acid, rescues human keratinocyte cell line, SCC, from cytotoxicity of ultraviolet light B. **Biol Pharm Bull**, v. 19, p. 984–987, 1996.

MIYAI, E; YAMAMOTO, I; et al. Inhibitory effect of ascorbic acid 2-O- α -glucoside on the pigmentation of skin by exposure to ultraviolet light. **Nishiniho J Dermatol (in Japanese)**, v. 58, p. 439–443, 1996.

MOLTENI, L. Dextran as drug carrier. In: GREGORIADIS, G (Org.). **Drug Carriers in Biology and Medicine**. Chapt. 6 ed. London: Academic Press, 1979. p. 107–125.

MONSAN, P et al. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 675–685, 2001.

MONSAN, P; LOPEZ, A. On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase. **Biotechnology and bioengineering**, v. 23, p. 2027–2037, 1981.

MONTOYA, G A; RIKER, W K. A study of the actions of bromide on frog sympathetic ganglion. **Neuropharmacology**, v. 21, n. 6, p. 581–585, 1982.

MOON, Y H et al. Synthesis and characterization of novel quercetin- α -D-glucopyranosides using glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 40, p. 1124–1129, 2007.

MOULIS, C et al. One-step synthesis of isomalto-oligosaccharide syrups and dextrans of controlled size using engineered dextransucrase. **Biocatal. Biotransform.**, v. 26, p. 141–151, 2008.

MUKAI, K et al. **Process for producing 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid**. . [S.l: s.n.]. , 2005

MUTO, N et al. Evidence for the in vivo formation of ascorbic acid 2-O- α -glucoside in guinea pigs and rats. **BioChem Pharmacol**, v. 42, p. 625–631, 1991.

MUTO, N et al. Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α -glucosidase (Biological Chemistry). **Agric Biol Chem**, v. 54, p. 1697–1703, 1990.

NAESSENS, M et al. Review *Leuconostoc* dextranase and dextran: production properties and applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 80, p. 845–860, 2005.

NAIDU, K A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. **Nutr J**, v. 2, p. 7, 2003.

NAKAMURA, A et al. Cloning and sequencing of an α -glucosidase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *A. nidulans*. **J Biotechnol**, v. 53, p. 75–84, 1997.

NEELY, W B; NOTT, J. Dextranase, an induced enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biochemistry**, v. 1, p. 1136–1140, 1962.

NELSON, R W; COUTO, C G. Seizures. In: NELSON, R W; COUTO, C G (Org.). **Manual of small animal internal medicine**. 2nd ed. ed. St Louis, Missouri: Elsevier Mosby, 2005. p. 991–1004.

NIGAM, M; GOYAL, A; KATIYAR, S S. High yield purification of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by phase partitioning. **Journal of Food Biochemistry**, v. 30, p. 12–20, 2006.

OGAWA, M et al. Recombinant alpha-glucosidase from *Aspergillus niger*. Overexpression by *Emmericella nidulans*, purification and characterization. **J Appl glycosci**, v. 53, p. 13, 2006.

OGUNI, H et al. Treatment of severe myoclonic epilepsy in infants with bromide and its borderline variant. **Epilepsia**, v. 35, n. 6, p. 1140–1145, 1994.

OKUDA, K et al. Successful control with bromide of two patients with malignant migrating partial seizures in infancy. **Brain**, v. 22, p. 56–59, 2000.

OLBY, N. Seizure management: diagnostic and therapeutic principles. 2008, Orlando, Florida: [s.n.], 2008. p. 567–570. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/navc/2005/SAE/230.pdf?LA=1>>.

ORIOL, E et al. Transfer reaction of glucosyl residues to maltose and purified oligosaccharides using highly active *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase. **Anne N Y Acad Sci**, v. 50, p. 210–215, 1987.

PANDEY, A et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnol Appl Biochem. Biotech Appl BioChem**, v. 31, p. 135–152, 2000.

PARENT, J. Recurrent Seizures in the dog. 2004, Cidade do México, México: [s.n.], 2004.

PAUL, F et al. Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides. **Carbohydr Res**, v. 149, p. 433–41, 1986.

PAUL, F et al. Production and purification of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512. **Ann NY Acad Sci**, v. 434, p. 267–270, 1984.

PEARCE, J. M. Bromide, the first effective antiepileptic agent. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, p. 72–412, 2002.

PEREIRA, A M et al. In vitro synthesis of oligosaccharides by acceptor reaction of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biotechnol Lett**, v. 20, p. 397–401, 1998.

PHUKAN, P. Iodine as an Extremely Powerful Catalyst for the Acetylation of Alcohols Under Solvent-free conditions. **Tetrahedron Lett**, v. 45, p. 4785–4787, 2004.

PLATT, S R. Anticonulsant use for epileptics. 2005, Cidade do México, México: [s.n.], 2005.

PODELL, M. Antiepileptic drug therapy. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 185–192, 1998.

PODELL, M. Seizures. In: PLATT, S R; OLBY, N J (Org.). **BSAVA manual of canine and feline neurology**. 6th ed ed. Dorset: British: [s.n.], 2004. p. 97–112.

PORTER, K A; BLACKBURN, G L; BISTRAN, B R. Safety of iron dextran in total parenteral nutrition: a case report. **J Am Coll Nutr**, v. 7, n. 2, p. 107–110, 1988.

POZNANSKY, M J; CLELAND, L G. **Drug Delivery Systems**. New York: Oxford University Press, 1980. p. 23–315

PROUSOONTORN, M H; PANTATAN, S. Production of 2-O-alpha-glucopyranosyl L-ascorbic acid from ascorbic acid and betacyclodextrin using immobilized cyclodextrin glycosyltransferase. **J Incl Phenom Macro**, v. 57, p. 39–46, 2007.

PURAMA, R K; GOYAL, A. Identification, effective purification and functional characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. **Bioresource technology**, v. 99, n. 9, p. 3635–42, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17892930>>. Acesso em: 5 jun. 2012.

PURAMA, R K; GOYAL, A. Purified Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 Exists as Single Homogeneous Protein: Analysis by Non-denaturing Native-PAGE. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, 2009.

QUESNEL, A D. Seizures. In: ETTINGER, S J; FELDMAN, E C (Org.). **Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat**. 6a. ed. ed. St Louis, Missouri: Saunders, 2005. p. 164–170.

REDEMANN, C E; NIEMANN, C. Acetobromoglucose. **Organic Syntheses**, v. 22, p. 1, 1942.

REDEMANN, C E; NIEMANN, C. Acetobromoglucose. **Organic Syntheses**, v. 3, p. 11, 1955.

RHEE, S H; LEE, C H. Properties of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Sikhae. **J Microbiol Biotechnol**, v. 1, p. 176–181, 1991.

ROBYT, J F. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. V. 51 ed. San Diego: Academic Press, 1995. p. 133–168

ROBYT, J F. **Encyclopaedia of Polymer Science**. In: KROSCWITZ, JI (Org.). . Vol.4. New York: Wiley-VCH, 1985. p. 753–767.

ROBYT, J F. Mechanism and action of glucansucrases. In: PARK, K H; ROBYT, JOHN F; CHOI, Y D (Org.). **Enzymes for Carbohydrate Engineering**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 1–21.

ROBYT, J F; EKLUND, S H. Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. **Carbohydr Res**, v. 121, p. 279–286, 1983.

ROBYT, J F; EKLUND, S H. Stereochemistry involved in the mechanism of action of dextranucrase in the synthesis of dextran and the formation of acceptor products. **Bioorg Chem**, v. 11, p. 115–132, 1982.

ROBYT, J F; TANIGUCHI, H. The mechanism of dextranucrase action. Biosynthesis of branch linkages by acceptor reactins with dextran. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 174, p. 129–137, 1976.

ROBYT, J F; WALSETH, T F. Production, purification and properties of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydrate Research**, v. 120, p. 287–294, 1979a.

ROBYT, J F; WALSETH, T F. Production, purification, and properties of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydrate research**, v. 68, p. 95–111, 1979b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621500840598>>. Acesso em: 5 jun. 2012.

ROBYT, J F; WALSETH, T F. The mechanism of "acceptor reactions" of *Leuconostoc mesenteroides* B512F dextranucrase. **Carbohydr Res**, v. 61, p. 433–445, 1978.

ROBYT, J F; YOON, Sh; MUKERJEA, R. Dextranucrase and the mechanism for dextran biosynthesis. **Carbohydr Res**, v. 343, p. 3039–3048, 2008.

RUMSEY, S C; LEVINE, M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans. **J Nutr BioChem**, v. 9, p. 116–130, 1998.

RUSSEL, R R B. Purification of Streptococcus mutans glucosyltransferase by polyethylene glycol precipitation. **FEMS microbiology letters**, v. 6, p. 197–199, 1979.

RYAN, M; BAUMANN, R J. Use and monitoring of bromides in epilepsy treatment. **Pediatr Neurol**, v. 21, n. 2, p. 523–8, 1999.

SAPALTRO, S M et al. patente acetobromodextran.pdf. . United States: [s.n.]. , 1994

SCHECHTER, B et al. Cis-platinum(II) complexes of carboxymethyl-dextran as potential antitumor agents. II. In vitro and in vivo activity. **Cancer BioChem Biophys**, v. 8, p. 289–298, 1986.

SCHNEBLE, H. Anticonvulsant bromide therapy once and today. **Nevenarzt**, v. 64, p. 730–735, 1993.

SEO, E S et al. Enzymatic synthesis and anti-coagulant effect of salicin analogs by using the *Leuconostoc mesenteroides* glucan sucrose acceptor reaction. **J. Biotechnol.**, v. 117, p. 31–38, 2005.

SEYMOUR, F R; KNAPP, R D. Structural analysis of dextran from strains of *Leuconostoc* and related genera, that contain 3-O- α -glucosylated-D-glucopyranosyl residues at the branched points, or in consecutive, linear position. **Carbohydrate Research**, v. 81, p. 105–129, 1980.

SHI, Q; JACKOWSKI, G. **Gel Electrophoresis of Proteins - A practical approach**. third ed. New York: Oxford University Press, 1998. p. 1–97

SHRIVASTAVA, S K; JAIN, D K; TRIVEDI, P. Dextran--potential polymeric drug carriers for flurbiprofen. **Pharmazie**, v. 58, n. 6, p. 389–391, 2003.

SIDEBOTHAN, R L. Dextran. **Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry**, v. 30, p. 371–444, 1974.

SMILEY, K L et al. A simplified method for preparing linear isomaltoligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 108, p. 279–283, 1982.

SMITH, M R; SAHNLEY, J; GOODMAN, N. Glucosyltransferase mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRL B-1355. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, p. 2723–2731, 1994.

SNELL, C R; SMYTH, D G. Biologically active macromolecular forms of oxytocin. [8-Lysine oxytocin as a suitable ligand. **BioChem J**, v. 165, n. 1, p. 43–47, 1977.

SORG, O; ANTILLE, C; SAURAT, J H. Retinoids, other topical vitamins, and antioxidants. **Photoaging**. [S.l.]: Marcel Dekker, 2004. p. 89–115.

STEINHOFF, B J; KRUSE, R. Bromide treatment of pharmaco-resistant epilepsies with generalized tonic-clonic seizures: a clinical study. **Brain Dev**, v. 14, n. 3, p. 144–149, 1992.

STEPHANI, U; BOENIGK, H E; BORUSIAK, P. Treatment of generalized tonic-clonic seizures in the severe myoclonic epilepsy of infancy syndrome with potassium bromide-results of a study in 93 children. **Neuropadiatrie in Klinik und Praxis**, v. 3, p. 101–106, 2004.

SU, D; ROBYT, J F. Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranase. **Carbohydr Res**, v. 248, p. 339–348, 1993.

SU, D; ROBYT, J F. Determination of number of sucrose and acceptor binding sites for *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranase and the confirmation of the two-site mechanism of dextran synthesis. **Arch Biochem Biophys**, v. 2, p. 471–476, 1994.

SUZUKI, S et al. Bromide, in the therapeutic concentration, enhances GABA-activated currents in cultured neurons of rat cerebral cortex. **Epilepsy Res**, v. 19, n. 2, p. 89–97, 1994.

SUZUKI, Y et al. Biosynthesis of ascorbic acid glucoside. (**Vitamins (Japan)**), v. 47, p. 259–267, 1973.

TAI, A et al. Bioavailability of a series of novel acylated ascorbic acid derivatives, 6-O-acyl-2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acids, as an ascorbic acid supplement in rats and guinea pigs. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 66, p. 1628–1634, 2002.

TAKAYANAGI, M et al. Two successful cases of bromide therapy for refractory symptomatic localization-related epilepsy. **Brain Dev**, v. 24, n. 3, p. 194–196, 2002.

TAKEBAYASHI, J; TAI, A; YAMAMOTO, I. Long-term radical scavenging activity of AA-2G and 6-Acyl-AA-2G against 1, 1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl. **Biol Pharm Bull**, v. 25, p. 1503–1505, 2002.

TANAKA, J; MIMAKI, T; TAGAWA, T. Efficacy of bromide for intractable epilepsy in childhood. **J Jpn Epil Soc**, v. 8, p. 105–109, 1990.

TANAKA, M; MUTO, N; YAMAMOTO, I. Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O- α -glucoside formation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1078, p. 127–132, 1991.

TANIGUCHI, M et al. Antioxidative and anti-aging activities of 2-O- α -glucopyranosyl- L-ascorbic acid on human dermal fibroblasts. **Eur J Pharmacol**, v. 674, p. 126–131, 2012.

TANYILDIZI, M S; OZER, D; ELIBOL, M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2291–2296, 2005.

TERAMOTO, N; SHIBATA, M. Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 4, p. 476–481, 2006.

TEZUKA, Y. Pullulan Nonaacetate; Assignment of Chemical Shifts of the Acetyl Protons and Acetyl Carbonyl Carbons by 2D-NMR Spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 155, 1998.

THOMAS, W B. Idiopathic epilepsy in dogs. In: THOMAS, W B (Org.). **The veterinary clinics of north america small animal practice - Common neurological problems**. Pennsylvania, Philadelphia: W B Saunders Company, 2000. p. 183–203.

TOYODA-ONO, Y et al. 2-O-(beta-D-Glucopyranosyl)ascorbic acid, a novel ascorbic acid analogue isolated from lycium fruit. **J Agric Food Chem**, v. 52, p. 2092–2096, 2004.

TSUCHIYA, H M et al. Factors affecting molecular weight of enzymatically synthesized dextran. **J Am Chem Soc**, v. 77, p. 2412–2419, 1955.

VETTORI, M H P B et al. Performance of response surface model for increase of dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045B under different experimental conditions. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, v. 1, n. 1, p. 29–35, 2012.

VETTORI, M H P B; FRANCHETTI, MARTINS, SANDRA MARA; CONTIERO, JONAS. Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextransucrase. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1440–1444, maio 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712001750>>. Acesso em: 6 maio 2012.

VETTORI, M H P B; MUKERJEA, R; ROBYT, J F. Comparative study of the efficacies of nine assay methods for the dextransucrase synthesis of dextran. **Carbohydrate research**, v. 346, p. 1077–1082, 2011.

WATANABE, Y et al. Suppressive effect of saturated acyl L-ascorbate on the oxidation of linoleic acid encapsulated with maltodextrin or gum arabic by spray-drying. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 3984–3987, 2002.

WILLEMOT, Rm; MONSAN, P F; DURAND, G. Effects of dextran on the activity and stability of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Ann NY Acad Sci**, v. 542, p. 169–172, 1988.

WINSLOW, ROBERT M.; VANDEGRIFF, KIM D.; INTAGLIETTA, MARCOS (Org.). **Advances in Blood Substitutes: Industrial Opportunities and Medical Challenges**. Boston: Birkhauser, 1997. p. 235

WOLFF, I A et al. Production of clinical-type dextran. **Ind Eng Chem**, v. 46, p. 370–377, 1954.

WOODBURY, D M; PIPPENGER, C E. Bromides. In: WOODBURY, D M; PENRY, J K; PIPPENGER, C E (Org.). **Antiepileptic Drugs**. 2. ed. New York: Raven Press, 1982. p. 797–801.

WOODY, R C. Bromide therapy for pediatric seizure disorder intractable to other antiepileptic drugs. **J Child Neurol**, v. 5, p. 65–67, 1990.

YACUBIAN, E M T. **Tratamento medicamentoso das epilepsias**. 2. ed. São Paulo: Editora Lemos, 2004. p. 318

YALPANI, M. Preparation and applications of dextran-derived products in biotechnology and related areas. **CRC Crit Rev Biotech**, v. 3, p. 375, 1986.

YAMAMOTO, I; SUGA, S; et al. Antiscorbutic activity of L-ascorbic acid 2-glucoside and its availability as a vitamin C supplement in normal rats and guinea pigs. **J Pharmacobiodyn**, v. 13, p. 688–695, 1990.

YAMAMOTO, I et al. Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. **J Nutr**, v. 122, p. 871–877, 1992.

YAMAMOTO, I; MUTO, N; NAGATA, E; et al. Formation of a stable L-ascorbic acid alpha-glucoside by mammalian alpha-glucosidase-catalyzed transglucosylation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1035, p. 44–50, 1990.

YAMAMOTO, I; MUTO, N; MURAKAMI, K; et al. L-ascorbic acid alpha-glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed alpha-glucosidases: its improved stability and structure determination. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 38, p. 3020–3023, 1990.

YAMAMOTO, I et al. Synthesis and characterization of a series of novel monoacylated ascorbic acid derivatives, 6-O-acyl-2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acids, as skin antioxidants. **J Med Chem**, v. 45, p. 462–468, 2002.

YAMAMOTO, I; MUTO, N. Bioavailability and biological activity of L-ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. (Tokyo) Sp, p. 161–164, 1992.

YAMAMOTO, I; MUTO, N; MIYAKE, T. **alpha-glycosyl-L-ascorbic acid, and its preparation and uses**. [S.l: s.n.], 1998.

YAMAMOTO, I; TANAKA, M; MUTO, N. Enhancement of in vitro antibody production of murine splenocytes by ascorbic acid 2- O-alpha-glucoside. **Int J Immunopharmacol**, v. 15, p. 319–325, 1993.

YAMASAKI, H; NISHI, K; MIYAKE, T. **Process for producing high 2- O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid**. [S.l: s.n.], 2001.

ZAHLEY, J C; SMITH, M R. Insoluble glucan formation by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, p. 1120–1123, 1995.

ZHANG, Z C et al. Enzymatic transformation of 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-Lascorbic acid (AA-2G) by immobilized alpha-cyclodextrin glucanotransferase from recombinant *Escherichia coli*. **J Mol Catal B Enzym**, v. 68, p. 223–229, 2011a.

ZHANG, Z C et al. Enzymatic transformation of 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by alpha-cyclodextrin glucanotransferase from recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol Bioproc Eng**, v. 16, p. 107–113, 2011b.

ZIEF, M; BRUNNER, G; METZENDORF, J. Hydrodextran. **Ind Eng Chem**, v. 48, p. 119–121, 1956.