

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

HIDRÓLISE ÁCIDA DA LEVANA EM FORNO DE MICROONDAS

Valdemir Cordeiro de Paula

Recife - 2004

Valdemir Cordeiro de Paula

HIDRÓLISE ÁCIDA DA LEVANA EM FORNO DE MICROONDAS

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Área de concentração: Microbiologia Aplicada
Orientadora: Profa. Dra. Glícia Maria Torres
Calazans.

Recife - 2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

DISSERTAÇÃO DE Mestrado apresentada por VALDEMIR CORDEIRO DE PAULA ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, como parte dos REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 11 DE FEVEREIRO DE 2004 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dr. IRAPUAN OLIVEIRA PINHEIRO
Pesquisador DCR/CNPq



Dra. MARIA DA PAZ CARVALHO DA SILVA
Departamento de Bioquímica - UFPE



Dr. CARLOS EDISON LOPES
Departamento de Antibióticos - UFPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA
Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Prof. Dr. Celso Pinto Melo

DIRETORIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Professora Dra. Ana Maria Santos Cabral

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
Professora Dra. Silene Carneiro do Nascimento.

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
Professora Késia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena

COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS
Professora Dra. Alda de Andrade Chiappeta

VICE-COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS
Professora Dra. Juliana Ferreira Cavalcanti

À minha esposa Jandira Alves Gadelha de Albuquerque de Paula;

Aos meus pais Cleizedauba Cordeiro do Nascimento
e Orlando Gonzaga de Paula;

Ao meu irmão Márcio Cordeiro Rodrigues da Silva

AGRADECIMENTOS

A Deus, o principal responsável por mais essa conquista em minha vida.

A minha esposa, pais e irmãos, pela compreensão e paciência nos momentos mais árduos desta jornada.

A Dra Glícia Maria Torres Calazans pela colaboração na minha formação científica e pessoal.

Ao Dr. Carlos Edison Lopes pelos ensinamentos, amizade, confiança e incentivo.

Ao pesquisador Irapuan Oliveira Pinheiro, pelas inúmeras funções desempenhadas. Agradeço por tudo que sei sobre informática e sua importante participação na realização de uma das etapas da dissertação.

A Dra Ivone A. Souza do laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimentais do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela colaboração desde de minha iniciação científica.

Aos professores do mestrado por repassarem seus conhecimentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Processos Fermentativos: Ana Carolina, Marcela, Valéria, Ivanilda, Naila, Salatiel, Veruska, Anfilófilo, Olímpio, Paula, Agenor, Maria Rodrigues, Suzete Mendonça, Felipe, Christine, que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis e pelos momentos de alegria e descontração.

A Fátima Regina pelo apoio técnico dado.

Aos demais funcionários do Departamento de Antibióticos pelos serviços prestados.

A todos os amigos que não foram mencionados mas que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas e siglas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Produção da levana (importância da ZAG 12).	6
2.2 Fracionamento da levana nativa	8
2.3 Polissacarídeos antitumorais	13
2.4 Uso de microondas na aceleração de reações químicas	15
2.5 Oligossacarídeos	22
3. OBJETIVO GERAL	29
3.1 Objetivos específicos	29

4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Fracionamento da levana por precipitação	30
4.2 Fracionamento acelerado por centrifugação	30
4.3 Fracionamento da levana produzida, por precipitação - após hidrólise ácida em forno de microondas.	31
4.4 Hidrólise ácida da levana.	32
4.5 Fracionamento de levana – Sem uso de centrifugação após hidrólise em forno de microondas.	32
4.6 Análise de oligossacarídeos	33
4.7 Análise de monossacarídeos	33
4.8 Testes antitumorais	34
4.8.1 Ensaio biológico	34
4.8.2 Testes de inibição tumoral	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Ensaio de biosseparação	36
5.2 Influência do peso molecular na atividade antitumoral	39
5.3 Obtenção de frutooligossacarídeos por hidrólise ácida de levana em forno de microondas	43
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Histograma de distribuição de frações mássicas de levanas produzida por *Z. mobilis* ZAG 12, obtidas pelo método de precipitação fracionada.

Figura 2. Histograma de distribuição de frações mássicas de levanas produzida por *Z. mobilis* ZAG 12, com o uso da centrifuga para separação das diferentes frações.

Figura 3. Variação da atividade antitumoral de frações da ZAG 12 contra o sarcoma 180 e carcinoma de Erhlich, em função de diferentes faixas de peso molecular.

Figura 4. Perfil das áreas relativas às concentrações dos oligossacarídeos com diferentes tempos de saída, nos cromatogramas, em minutos, versos o tempo de hidrólise. Os oligossacarídeos representados na legenda por DP, estão alinhados em ordem crescente de saída aos picos. DP 14 saída com 17 minutos e DP 3 saída com 41 minutos.

Figura 5. Perfil das áreas relativas às concentrações dos oligossacarídeos com um tempo de saída dos picos em 17, 18 e 19 minutos, relativos aos DP 14, 13, e 12, respectivamente, em diferentes tempos de hidrólise.

Figura 6. Perfil das áreas relativas às concentrações dos oligossacarídeos com um tempo de saída dos picos 20, 21 e 22 minutos, relativos aos DP 11, 10, e 9, respectivamente, em diferentes tempos de hidrólise.

Figura 7. Perfil das áreas relativas às concentrações dos oligossacarídeos com um tempo de saída dos picos em 24, 26, 29, 33 e 38 minutos, relativos aos DP 8, 7, 6, 5 e 4, respectivamente, em diferentes tempos de hidrólise.

Figura 8. Perfil das áreas relativas às concentrações do oligossacarídeo com um tempo de saída do pico em 41 minutos, em diferentes tempos de hidrólise.

Figura 9. Perfil de concentração de frutose em diferentes tempos de hidrólise.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre o tempo de hidrólise e a quantidade de picos de oligossacarídeos registrados no cromatograma resultante da hidrólise ácida da levana em forno de microondas.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

T = Temperatura (°C)

NRIU x s = Nano unidades de índice de refração vezes segundo

OLIGO -= Oligossacarídeos

DP = Grau de polimerização

RESUMO

Levana produzida por *Zymomonas mobilis*, linhagem ZAG 12, em meio de sacarose foi hidrolisada em forno de microondas, o qual foi usado como fonte aquecedora, em lugar do banho-maria tradicional. Na hidrólise foi utilizada uma solução de levana a 20g/L, com ácido clorídrico 0,1M. As diferentes faixas de pesos moleculares foram separadas por precipitação fracionada. As soluções de levana foram hidrolisadas em tempos que variaram de 0,5 a 5,0 minutos. Após hidrólise ácida da levana em forno de microondas com potência de 650W, foram obtidas frações de levana de baixo peso molecular, oligossacarídeos e frutose. Os oligos e monossacarídeos, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fase móvel foi água deionizada e as colunas REZEX-RS0 OLIGOSACCHARIDE (12 μ m x 10mm x 200mm) e BECKMAN U-SPHEROGEL CARBOHYDRATE (10 μ m x 6,5mm x 300mm), respectivamente. Os resultados mostraram ocorrência de variação na resposta antitumoral em função dos diferentes pesos moleculares. Constatou-se que as frações mais ativas foram F – 80 e F - 70, que apresentaram a maior inibição tumoral contra o sarcoma 180 (89%), e carcinoma de Ehrlich (79%). A fração F – 90 não apresentou inibição tumoral significativa para o sarcoma 180 (39,5%). No entanto a F – 60 apresentou 77% de inibição contra o sarcoma 180. A separação dos frutooligossacarídeos, com diferentes graus de polimerização, e dos monômeros de frutose foi obtida através de cromatografia por CLAE. Três minutos de hidrólise mostrou ser a melhor condição, dentre as testadas, para obtenção de oligossacarídeos a partir de levana.

ABSTRACT

The levan used was produced by *Zymomonas mobilis*, strain ZAG 12, in sucrose way was acid hydrolysis in microwaves oven, which was used as a hot source, instead of the traditional bath-maria. In the hydrolysis was used a levan solution 20g/L with 0,1M chloridric acid. The different molecular weights bands had been separate by the precipitation method. The levan solution was hydrolyses in times of: 0,5 - 5,0 minutes. After the levan acid hydrolysis in microwaves oven with power the by 650W, it had been gotten low molecular weight levan, oligosaccharide and fructose. The oligos and monosaccharide was analyzed by liquid chromatography of high efficiency (HPLC). The mobile phase was deionation water, column REZEX-RSO OLIGOSACCHARIDE (12 μ m \times 10mm \times 200mm) and the column BECKMAN USPHEROGEL CARBOHYDRATE (10 μ m \times 6,5mm \times 300mm), respectively. the results had shown variation occurrence in the antitumor reply because the different molecular weights. evidence that the fractions most active had been F – 80 and F – 70, presented greater tumoral innibition against sarcoma 180 (89%) and Erhlich carcinoma (79%). Fraction F – 90 did not present significant tumoral innibition for sarcoma 180 (39,5%). However the F – 60 presented inhibition against sarcoma 180 of 77% the fructooligosaccharide separation for different polymerization degrees and fructose monomer identity was possible through the HPLC. Three minutes of hydrolysis it showed to be the best condition, amongst the tested ones, for oligosaccharide attainment from levan.

1.0 INTRODUÇÃO

A levana é um polissacarídeo linear constituído de resíduos (2-6)- β -D-frutosuranosil, contendo poucos pontos de ramificações (2-1)- β -D-frutosuranosil, (Kennedy et al., 1989; Doelle et al., 1985). Entretanto, outros autores citam a presença de várias ramificações na molécula, (Marshall & Weigel, 1980). O peso molecular médio encontrado para levanas depende da sua origem. Levanas de origem vegetal, geralmente, tem baixo peso molecular médio, com um único ponto de ramificação, enquanto levanas microbianas apresentam alto peso molecular médio, podendo conter cadeias ramificadas (Han, 1990).

As propriedades físico-químicas das levanas microbianas dependem das condições do meio em que o microrganismo cresce. O polímero demonstrou ser levorotatório, amorfo ou microcristalino, solúvel em água e insolúvel em etanol absoluto (Han, 1990). Análise em cromatografia de alta eficiência (CLAE) tem demonstrado que o peso molecular do polímero é da ordem de 10^6 daltons (Kennedy et al., 1989).

As biossínteses da dextrana e da levana são totalmente diferentes de outras vias metabólicas de polissacarídeos. Elas não envolvem sistemas multienzimáticos, açúcares ativados ou carreadores de lipídeos-intermediários. A produção é inteiramente extracelular e compreende a polimerização enzimática catalisada de um oligossacarídeo, que por sua vez provê diretamente a energia necessária para síntese do polissacarídeo (Pace, 1987; Kennedy et al., 1989).

A *Zymomonas mobilis*, bactéria Gram-negativa, utiliza em seu processo fermentativo a sacarose como fonte de carbono. Produz dois tipos de levana, uma

de alto peso molecular precipitável pelo etanol e outra de baixo peso molecular denominada de levana não precipitável, conhecida como levana solúvel em meio aquoso (Viikari, 1984a e b). A *Z. mobilis* é uma bactéria anaeróbica aerotolerante, porém utiliza uma via metabólica de via Entner-Doudoroff para degradação de hexoses, seguida pela descarboxilação do piruvato, característica de bactérias (Gibbs & DE Moss, 1951).

Na polimerização da frutose para formação da levana existem, em *Z. mobilis*, três tipos de reação de transfrutoseilação, nas quais água, sacarose ou levana são os aceptores, levando a frutose ou oligossacarídeos ao aumento da polimerização para levana. A transferência de unidades frutoseil para C-1 ou C-6 leva a formação de oligossacarídeos (Viikari, 1986).

O tipo de frutoseilação depende da concentração de sacarose e de glicose no meio (Viikari, 1986). É dito, também, que os tipos do processo (batelada ou contínuo) conduzem a diferentes proporções de produtos frutoseilados. Nos processos em batelada é produzida pouca levana devido à rápida acumulação da glicose que inibe a levansacarase, e leva à formação de oligossacarídeos (Viikari, 1986).

A levansacarase é uma enzima chave na síntese de levana assim como de oligossacarídeos de frutose. Pesquisadores relatam que frutooligossacarídeos provavelmente sejam levanas de cadeia curta, meros intermediários da produção de levana (Kohanyi & Dedonder, 1951; Dedonder & Noblesse, 1953; French & Wild, 1955). Devido a isto, uma tentativa de isolamento e de identificação de oligossacarídeos formados durante o processo de produção de levana foi proposta por (Feingold *et al.*, 1955) empregando *Aerobacter levanicum*.

A preocupação com a produção de polissacarídeos, a exemplo de outros produtos, não pode ser limitada apenas ao controle das condições de fermentação. Não adianta otimizar a produção, sem que se tenham meios eficazes que garantam a recuperação do produto ao final do processo (Lima, 2001). O fracionamento ainda é o método mais utilizado e se aplica à separação de espécies poliméricas quimicamente homogêneas. Este processo consiste no ajuste da solução para que as duas fases líquidas (solução aquosa, contendo o polímero solúvel, e o solvente orgânico que é agente precipitante) estejam em equilíbrio, remoção de uma das fases e ajuste nas condições das soluções leva a obtenção de uma segunda fase separada, e assim sucessivamente (Calazans, 1997).

As levanas produzidas por vias fermentativa apresentam curvas de distribuição de frações com formatos gaussianos, e com elevado índice de polidispersão (Calazans, 1997; Calazans et al., 2000).

Os polissacarídeos são produzidos em faixas de pesos moleculares diferentes que se sobrepõem (Calazans, et al., 1997). De acordo com a linhagem bacteriana produtora e com temperatura de produção do biopolímero, o polissacarídeo apresentará diferentes curvas de distribuição de pesos moleculares e, obviamente, pesos moleculares médios diversos. Em decorrência da distribuição de pesos moleculares, além dos polissacarídeos são formados oligossacarídeos no processo de biossíntese (Calazans, 1997). Como a levana possui atividade antitumoral, é de se esperar que diferentes tamanhos moleculares sejam absorvidos ou eliminados pelo organismo, de maneiras diversas (Calazans, 1997).

Em trabalhos anteriores, De Paula (2001), dando continuidade aos experimentos realizados por Calazans et. al. (2000), iniciou testes com faixas de pesos moleculares leves contra tumores em camundongos, sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich. Utilizou-se o forno de microondas como fonte catalisadora para obtenção de tais frações. Em seguida, foi realizada uma separação por precipitação e decantação das faixas de pesos moleculares. A hidrólise ácida em forno de microondas tornou possível a obtenção de frutooligossacarídeos e monômeros de frutose a partir da levana nativa.

Uma rota para a produção dos frutooligossacarídeos seria por via fermentativa, porém a maior dificuldade ainda consiste na extração destes oligossacarídeos resultantes do processo fermentativo (Lobato, 2003). Uma outra opção quimicamente viável poderia ser através do processo de hidrólise ácida controlada. Para que este processo seja viável, é necessário um controle eficiente das etapas de hidrólise.

A levana é uma fonte potencial para obtenção de frutooligossacarídeos e frutose por hidrólise ácida. No presente trabalho utilizou a frutana produzida por via fermentativa a 25°C utilizando a linhagem de *Z. mobilis conhecida como ZAG 12*. Esta é a linhagem de melhor rendimento na produção de frutooligossacarídeos, como matéria prima para hidrólise ácida, as que estão disponíveis na coleção no Departamento de Antibióticos.

Os frutooligossacarídeos são descritos como moléculas que apresentam ligações do tipo $\beta(2\rightarrow1)$ trazendo um resíduo de D-glicose no fim da cadeia e são estáveis na faixa de pH normal dos alimentos (4,0 – 7,0). Uma vez liofilizado e sob

refrigeração, os frutooligossacarídeos serão conservados por até um ano, sendo que após este período o existe o risco de hidratação do produto (Yun, 1996).

Um grupo específico de oligossacarídeos tem atraído interesse comercial, os frutooligossacarídeos. A indústria alimentícia é a principal interessada nos oligossacarídeos por ser um alimento funcional. Os frutooligossacarídeo são usados, em alguns países, como substitutos da sacarose por não serem digeridos pelos sucos do trato gastrointestinal, porém degradáveis devido a bactérias presentes no cólon. Este fato os torna ideais para utilização por diabéticos. Os frutooligossacarídeos são fibras solúveis de baixo peso molecular fermentado por bifidobactérias ou lactobacilos. Sugere-se que o consumo de frutooligossacarídeos seja diretamente proporcional ao aumento da população das bifidobactérias, impedindo a proliferação de bactérias patogênica, suprimindo a ação de bactérias putrefativas e prevenindo a diarreia ou a obstipação (Hidaka, 1986). Em consequência, os níveis metabólicos tóxicos são reduzidos, melhorando os níveis de lipídeos e glicose séricos, controlando a pressão arterial e, finalmente, produzindo nutrientes e aumentando a biodisponibilidade de sais minerais. O aumento da biodisponibilidade dos sais minerais é decorrente da produção de ácidos graxos de cadeia curta por bactérias intestinais, podendo ser usado como complemento alimentar (Hidaka, 1986). Uma outra propriedade importante destes oligossacarídeos, foi a utilização de conjugados oligossacarídeo-proteína, no diagnóstico e vacinas contra tuberculose (Pawlowski, 2002).

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção da levana

Os polissacarídeos são carboidratos de alto peso molecular e podem ser vistos como monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, que se formam com eliminação de água. São os compostos carbonados mais abundantes da biosfera, ocorrendo em quase todos os seres vivos, onde exercem diferentes funções (Whistler & Corbett, 1957; Bobbio & Bobbio, 1989; Brock & Madigan, 1991; Lehninger, 1993; Glazer & Nikaido, 1995; Stryer, 1996). Difere-se pela natureza de suas unidades monossacarídicas repetitivas, pelo comprimento de suas cadeias e pelo grau de ramificação. Os polissacarídeos que tem função estrutural são classificados em Homo e Heteropolissacarídeos, localizados nas paredes e envoltórios celulares, nos espaços intercelulares e no tecido conjuntivo, onde dão forma, elasticidade ou rigidez aos tecidos vegetais e animais, bem como, suporte aos organismos unicelulares. Funcionam como polissacarídeos de reserva metabólica de plantas e de animais; e como polissacarídeos de proteção, devido a sua capacidade de reter grandes quantidades de água, fazendo com que os processos enzimáticos não sejam interrompidos, mesmo em condições de desidratação (Bobbio & Bobbio, 1989; Stherland, 1990; Brock & Madigan, 1991; Lehninger, 1993; Stryer, 1996).

A retomada das pesquisas com polissacarídeos com aplicações comerciais se deve ao fato de serem obtidos de fontes de baixo custos, constituindo uma família de polímeros com grande diversidade de propriedades e grande

versatilidade. A engenharia genética é a mais nova técnica para modificações de plantas e microorganismos, gerando modificações enzimáticas e reações com o propósito de aumentar a produtividade e segurança da utilização do polímero. Deve-se levar em consideração o fato de que os polímeros industriais são, especialmente, produtos de alto valor comercial. A viabilidade econômica e a ausência de toxicidade fazem com que os polímeros sejam largamente utilizados em diversos campos das indústrias (BeMiller, 1988).

A indústria usa grandes quantidades de polissacarídeos de origens vegetais e microbianas e novas fontes ainda estão por ser descobertas. Muitos microorganismos produzem polissacarídeos e alguns deles os produzem extracelularmente, em quantidades tais, que se torna econômico o cultivo de microorganismos e a recuperação do polímero produzido a exemplo da dextrana e xantana (Magaritis & Pace, 1985; Han, 1990).

As biossínteses da dextrana e da levana são completamente diferentes de outras vias biossintéticas de polissacarídeos. Elas não envolvem sistemas multienzimáticos, açúcares ativados ou carreadores lipídeos-intermediados. A produção é inteiramente extracelular e compreende a polimerização enzimacatalisada de um oligossacarídeo, que provê diretamente a energia e o carbono necessários (Pace, 1987; Kennedy et al., 1989 apud Calazans, 1997).

A levana é um exopolissacarídeo formado por unidades de frutose que são polimerizadas pela ação da levanassacarase, possui propriedades espessante, emulsificante e estabilizante (Han, 1990; Van Geel-Schatten et al., 1999). Estas propriedades fazem da levana um produto promissor para aplicação na indústria de alimentos. Além disso, possui propriedade imunomoduladora e atividade

antitumoral comprovada contra sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich (Calazans, 1997; Calazans et al., 2000), o que poderá representar, futuramente, um valioso recurso no combate ao câncer, sem a toxicidade apresentada pelos quimioterápicos antineoplásicos até então em uso.

Apesar de alguns trabalhos afirmarem que um percentual de aproximadamente 2% é desviado para a produção de levana em *Zymomonas mobilis* em cultivo descontínuo (Viikari, 1988), observa-se uma grande variabilidade no rendimento, de linhagem para linhagem (Dawes et al., 1996; Viikari, 1984^a; Calazans et al., 1989; Reiss & Hartmeier, 1990).

Analisando-se dados da literatura sobre a produção de levana, percebem-se algumas contradições em relação aos fatores que proporcionam uma melhor produção. Muito ainda tem que ser esclarecido, tanto em relação aos processos de produção, quanto aos de recuperação do produto puro, para que seja viável a produção em escala industrial. (Lima, 2001).

2.2 Fracionamento da levana nativa

O fracionamento é um processo para separação de espécies poliméricas quimicamente homogêneas, em uma mistura de polímeros com diferentes pesos moleculares chamados “frações”. As diversas frações diferem em peso molecular médio e possuem uma distribuição dos pesos moleculares mais estreita do que o material de origem. Idealmente, cada fração deveria ser monodispersa em peso molecular, mas, na prática, tal coisa não acontece e as várias frações que são coletadas sempre se sobrepõem em alguma extensão (Rudin, 1982).

O fracionamento pode ser classificado de duas formas: analítico ou preparativo. Pequenas quantidades do polímero são requeridas para um fracionamento analítico, assim como para determinação de distribuição de peso molecular, sem que se esqueça, entretanto, que a quantidade de polímero necessária na determinação variará, de acordo com o método a ser utilizado. No fracionamento preparativo são obtidas grandes quantidades do polímero disperso em faixas estreitas de peso molecular. Os fracionamentos preparativos são desenvolvidos por um processo em batelada, cujas técnicas mais conhecidas são a cromatografia preparativa de permeação em gel e a precipitação por solventes orgânicos (McCarffery, 1970).

Existem vários métodos de fracionamento de polímeros em uso atualmente, como a precipitação fracionada, fracionamento em coluna gel, ultracentrifugação, ultrafiltração, destilação molecular e outros (McCaffery, 1970). A precipitação fracionada consiste na precipitação isotérmica de uma pequena quantidade de polímero de alto peso molecular presente na solução que é iniciada pela adição de uma determinada quantidade de uma terceira substância não solvente ao polímero.

O fracionamento por precipitação com solvente, constitui-se de um sistema bifásico líquido-líquido usando um antisolvente, como o etanol (Hines et al., 1954; Wolff et al., 1954; Watanabe et al., 1973; Slodki & Cadmus, 1979, Gabas & Laguérie, 1992; Lee et al., 1992). O equilíbrio de fases, neste sistema ternário, depende da massa molecular do polímero. Em ambas as fases, há uma coesão entre as fases líquidas das moléculas de polímero que estão distribuídas diferentemente na solução. Quanto menor a massa molecular maior a solubilidade

no sistema e a maioria delas permanecerá na fase superior. De forma equivalente, moléculas com massas moleculares maiores têm forte tendência a passar para fase inferior. É possível conduzir-se um ótimo fracionamento de polímeros polidispersos, a princípio, com qualquer distribuição de massa molecular (Neuchl & Mersmann, 1995).

A precipitação é um método fácil e direto de purificação de solutos biológicos. A maioria das precipitações forma um produto não cristalino. Tais precipitados amorfos freqüentemente apresentam cristalização lenta. Eles podem agregar várias espécies ou quantidades significantes de sais adsorvidos ou solventes (Calazans, 1997).

A recuperação de um determinado produto, às vezes, torna-se mais difícil que sua própria produção. O número de variáveis que compõem o processo de extração dificulta a investigação para obtenção de uma forma rentável, produtiva e economicamente viável. Isto se ramifica, especialmente, com polissacarídeos microbianos (Galindo, 1985). Apesar das dificuldades, há registros uma grande quantidade de patentes nessa área. Os avanços referem-se às modificações químicas do polímero nos chamados processos pós-fermentativos (Galindo, 1985).

As macromoléculas crescem, usualmente, de forma aleatória. Além disso, quando se fala em peso molecular de uma macromolécula, refere-se a uma média de pesos de um número de cadeias que têm a uma distribuição maior que uma coleção de macromoléculas com mesmo peso molecular (monodispersa). Assim, para se ter polímeros monodispersos, estes deveriam ser formados a partir de um iniciante pré-formado que se propaga por um mecanismo simples, não susceptível

a transferência de cadeias, sem nenhum mecanismo de terminação e crescidos simultaneamente McCaffey (1970).

O fracionamento consiste no ajuste das condições da solução para que as duas fases líquidas estejam em equilíbrio, para a remoção de uma das fases. Um novo ajuste da solução leva a obtenção de uma segunda fase separada e assim sucessivamente (Calazans, 1997). As solubilidades diferenciais das macromoléculas de diferentes tamanhos determinam a distribuição dos diferentes pesos moleculares no fracionamento. Considerando-se uma espécie polimérica com um certo grau de polimerização em solução, a sua separação em duas fases é possível pela adição de um não solvente, gerando uma diminuição da afinidade do solvente pelo polímero, fazendo com que as moléculas com massas moleculares menores tenham solubilidade maior ao sistema ternário e a maioria delas permanecerá na fase superior. Porém, moléculas com massas moleculares maiores têm uma forte tendência a passar para a fase inferior, através da diminuição da temperatura ou da adição de um não solvente (Rudin, 1982; Neuchl & Mersmann, 1995).

Na determinação do peso molecular de algumas frações pelo método viscosimétrico, por exemplo, necessita-se da etapa de refracionamento, ou seja, fracionamento de uma fração já obtida para aumentar o grau de pureza da espécie polimérica, em virtude do método se aplicar a espécies monodispersas (De Paula, 2001).

Um fracionamento realizado de forma crescente, caracteriza-se pela adição progressiva da quantidade do solvente na solução. De acordo com o percentual do solvente na solução, a tendência é a precipitação das frações de maior massa

molecular, com as de menor massa molecular permanecendo no sobrenadante. Quanto maior for o percentual do solvente na solução, menor será a massa molecular do polímero precipitável. Inicialmente precipitam as frações mais pesadas, classificadas como F-10 (fração obtida quando o percentual de etanol é de 10%). Posteriormente o não solvente sofre um reajuste no seu percentual e, conseqüentemente, precipitando uma fração mais leve, F-20 e assim sucessivamente (De Paula, 2001).

Em trabalho realizado por De Paula (2001), faixas de pesos moleculares mais leves, foram obtidas a partir da hidrólise ácida de soluções de levana nativa, em forno de microondas. Por esta técnica, foram obtidas e testadas as frações (F-60 e F-70) contra sarcoma 180 e o carcinoma de Erhlich. As diferentes frações de levana possuem atividades antitumorais variadas para tumores diversos. Portanto, a inibição de uma linhagem tumoral deve ocorrer pela ação de determinada faixa de peso molecular de levana. A fração F-60 (mais pesada), apresentou uma inibição de 74% contra o sarcoma 180 e a F-70 (mais leve), apresentou inibição de 79% contra o carcinoma de Erhlich.

Uma vez que os polímeros são formados de forma randômica, resultando em uma mistura de pesos moleculares. Torna-se, portanto, dependo do destino final do polímero, imprescindível a realização de fracionamento, para que se consiga separar frações de pesos moleculares (Lima, 2001).

2.3 Polissacarídeos antitumorais

A evolução da oncologia experimental tem permitido a identificação de novos compostos úteis no tratamento do câncer. Devido a uma variedade de tecidos de tumores experimentais disponíveis, e devido ao seu fácil manuseio, estes sistemas têm sido usados em animais, para a avaliação de atividade antitumoral de diversas substâncias (Lima, 2001).

Inúmeros trabalhos relatam a ação antitumoral de polissacarídeos como a lentinana, curdulana, grifolana, esquizofilana, escleroglucana (Chihara, et al., 1969; Chihara et al., 1970; Okuda et al., 1972; Sutherland, 1990; Chihara, 1992; Kulicke et al., 1997; Sutherland, 1998; Borchers et al., 1999) e a levana (Leibovici et al., 1986; Calazans et al., 1997). Destes polissacarídeos com ação imunomoduladora e antitumoral, a lentinana e a esquizofilana alcançaram importância clínica no tratamento do câncer (Taguchi et al., 1988 apud Franz et al., 1985).

Apesar do número de publicações sobre o tema, os mecanismos pelos quais estes polímeros agem ainda não estão bem esclarecidos. É relatada na literatura, que estes mecanismos estariam relacionados com uma ação tóxica direta sobre as células tumorais, com uma ação indireta, medida pelo sistema imune, ou pela combinação de ambos (Leibovici & Stark, 1984; Kulicke et al., 1997).

Lima (2001) analisou a atividade antitumoral de alguns polissacarídeos, observando uma variação na inibição do crescimento tumoral entre os

polissacarídeos testados (levana, dextrana, pululana e inulina). A levana apresentou o maior grau de inibição tumoral 84%, seguida pela dextrana 78%. A inulina e a pululana tiveram uma inibição de 52% e 51%, respectivamente.

Devido às divergências não só com relação aos mecanismos de atuação destes polissacarídeos, mas às diversidades das estruturas químicas, ligações e pesos moleculares dos mesmos, que estariam envolvidos no processo de inibição tumoral, observa-se a necessidade de estudos mais detalhados sobre este assunto.

Segundo De Paula (2001), as amostras de levana foram submetidas a progressivos tempos de hidrólise entre 0,5 e 13 minutos. A dosagem de açúcares redutores tem demonstrado que 5 minutos de aquecimento no forno de microondas, com uma potência de 650W, foram suficientes para hidrolisar completamente a levana. Em banho-maria, eram necessários 30 minutos, mantidos nas mesmas condições confirmando a rapidez e agilidade proporcionada pela ação de microondas no processo de quebra para obtenção de pesos moleculares menores (De Paula, 2000).

As hidrólises em forno de microondas proporcionaram quantidades suficientes de levanas, com faixas de pesos moleculares variados, viabilizando assim, os testes antitumorais em camundongos. Levanas obtidas de diferentes microorganismos possuem atividades antitumorais variadas contra tumores diversos. Portanto, a inibição de uma linhagem tumoral deve ocorrer pela ação de determinada faixa de peso molecular (Calazans et. al., 2000).

2.4 Uso de microondas na aceleração de reações químicas

Microondas são ondas de radiação eletromagnética exatamente igual às ondas de rádio, mas com um comprimento de onda mais curto e com energia mais intensa. As microondas são geradas por uma espécie de tubo de vácuo, chamado magnétron, que as descarrega para dentro do forno, uma caixa metálica selada em que as microondas ficam em movimento continuamente de um lado para outro enquanto o magnétron estiver operando.

A hidrólise ácida pelo modo tradicional, usando banho-maria para aquecimento, envolve diferentes concentrações de ácido sulfúrico ou clorídrico, com tempo de reação de 2 a 3 horas (Li Betty, 1998). Substituindo-se a fonte aquecedora por um aparelho de microondas, incontestavelmente, reduz-se o tempo de hidrólise, chegando-se a realizar o mesmo processo em apenas 6 minutos (De Paula 2001).

A ocorrência de hidrólise em uma solução polimérica pode ser evidenciada pela queda da viscosidade na solução, em temperatura controlada, usando um viscosímetro. A viscosidade de soluções macromoleculares sofre influência de diversos fatores, tais como: temperatura, peso molecular e sua distribuição, conformação e tamanho da molécula, volume ocupado em solução, concentração do polímero, flexibilidade da cadeia e velocidade de cisalhamento empregada para obtenção da medida do tempo. Através de medidas da viscosidade intrínseca de soluções poliméricas, extremamente diluídas, é possível calcular com precisão, o peso molecular médio viscosimétrico de polímeros (De Paula, 2001).

De acordo com Li Betty (1998), o uso de microondas apresenta a vantagem de não provocar alterações nos açúcares após a hidrólise. Segundo os testes do autor, os açúcares apresentavam-se quimicamente semelhantes aos hidrolisados em banho-maria. Daí concluir-se que a energia da microonda na reação, poderia ser usada, pois aumenta o rendimento e diminui o tempo de hidrólise (Li Betty, 1998).

A substituição do banho-maria pelo forno de microondas foi feita visando-se reduzir os tempos de hidrólise. O forno de microondas emite ondas de alta frequência, gerando um campo magnético. As moléculas polares ficam alinhadas girando em um ângulo de 180° sucessivas vezes, transformando energia mecânica em calor (De Paula, 2201). O calor gerado possibilita a hidrólise ácida da levana formando frações de pesos moleculares mais leves que a levana nativa. Com a obtenção destas novas frações, é possível a ampliação na investigação do uso das levanas em testes farmacológicos.

Em todo o mundo, existe uma necessidade natural de tornar tudo mais rápido e prático. O forno de microondas aumentou a praticidade da vida moderna. De acordo com Li Betty (1998), a realização de uma reação que duraria de 2 a 3 horas nos modos convencionais passa a ter os mesmos resultados em apenas 6 minutos com o uso de .microondas.

Estudos sobre os mecanismos de funcionamento do forno de microondas e sua aplicação na biotecnologia são cada vez mais abrangente. O forno de microondas tornou-se uma importante fonte aquecedora em diferentes reações, de uma simples hidrólise até reações de metilação, esterificação, acetilação, conjugação.

Um estudo comparativo entre o forno de microondas e o banho-maria com fonte aquecedora na hidrólise ácida do polissacarídeo levana e do dissacarídeo sacarose foi realizado por De Paula (2001). O objetivo foi avaliar a possibilidade do forno de microondas em substituição ao banho-maria tradicional. O uso do forno de microondas na hidrólise do dissacarídeo reduziu o tempo de reação, anteriormente de 15 minutos em banho-maria, para 1,5 minutos. Os açúcares redutores totais (ART) resultantes foram dosados pelo método do DNSA. A concentração de sacarose utilizada na preparação da solução foi equivalente com a concentração (ART) encontrada na amostra que foi submetida a hidrólise por 1,5 minuto.

Nos testes de hidrólise do polissacarídeo, foram utilizadas levanas produzida pelas linhagens CP 4 a 30°C e ZAG-12 a 35°C, que apresentaram pesos moleculares médios: Mw 7.900 e Mw 1.570.000. Usando banho-maria a 100°C eram necessários 30 minutos para hidrolisar completamente a levana em monômeros de frutose. A hidrólise no forno de microondas, com potência de 650W permite que, em apenas 5 minutos, obtenha-se resultado semelhante ao método de hidrólise em banho-maria tradicional.

Além da levana, também foram realizados testes com o amido que apresenta ligações, entre as moléculas, bem mais rígidas que a frutana. Este foi escolhido devido sua abundancia na natureza e por possuir grande importância industrial. A solução de amido, nas mesmas condições a que foram submetidos o di e o polissacarídeo, ratificar a possibilidade de utilização do forno de microondas como substituinte do banho-maria para hidrólise ácida de diversos polímeros. Comprovou-se também, que é possível a redução total da molécula de amido à

glicose, em forno de microondas, num tempo de 10 minutos. Em banho-maria não se chegou aos mesmos valores de concentração de glicose livre, mesmo utilizando-se 30 e 60 minutos de hidrólise (De Paula, 2001).

Joergensen (1995) utilizou o forno de microondas como método rápido para hidrólise de proteínas. As amostras foram aquecidas a 150°C com tempo entre 10 – 30 minutos, enquanto que em métodos convencionais usa-se 110°C durante 24 horas. Os métodos tradicionais e com microondas foram testados com amostras puras de proteínas, carboidratos, gorduras e ácidos nucleicos. O método usando microondas mostrou resultados semelhantes e até mesmo melhores, em algumas situações, método convencional. Os efeitos da quebra e a estabilidade dos agentes foram testados, foi visto que a degradação do ácido tioglicólico estabiliza a metionina e em parte o triptofano. A degradação do fenol estabiliza a tirosina, fenilalanina e a histidina (Joergensen, 1995).

O aquecimento em forno de microondas é usado principalmente para acelerar as reações químicas e para hidrolisar de diversos polímeros. A hidrólise da albumina, por exemplo, apresenta rendimentos semelhantes aos métodos convencionais, na formação de aminoácidos livres (Guardia, 1993). Além da preocupação em comparar os métodos de hidrólise, o autor realizou um processo investigativo sobre os efeitos dos seguintes parâmetros de hidrólise em forno de microondas: potência do forno, tempo de hidrólise, volume da solução sob hidrólise e finalmente na concentração do ácido utilizado. O estudo em cromatografia mostrou que o aquecimento em forno de microondas não causou alterações químicas nos aminoácidos resultantes da hidrólise (Guardia, 1993).

O estudo das hidrólises do ácido fítico foi determinado indiretamente através da dosagem de fosfatos resultantes das hidrólises. O método desenvolvido é eficaz para avaliação de formulações farmacêuticas, pois não necessita da utilização de produtos para obtenção de uma suspensão homogênea aquosa, evitando ainda, as pequenas quebras ocorridas nas amostras analisadas pelo método convencional (Salvador, 1998).

Salvador (1998), em seus experimentos, avaliou as concentrações de diferentes fases de hidrólises com diversos ácidos inorgânicos. O autor constatou uma melhora na diluição total e na homogeneidade dos fosfatos para determinação indireta das hidrólises do ácido fítico, após aquecimento em forno de microondas.

O forno de microondas tem sido utilizado, também, na química orgânica, para acelerar o processo de hidrólise dos benzodiazepínicos na formação de seus correspondentes benzofenóis sob uma potência de 650W durante 10 minutos, com rendimento semelhante ao método tradicional e sem comprometimento químico da molécula resultante. Os benzofenóis são muito reativos e podem ser facilmente convertidos para compostos diazodiazepínicos que podem ser determinados na faixa do visível. Eles também interagem com surfactantes não iônicos, desta maneira misturas binárias de benzodiazepínicos podem ser analisadas simultaneamente após hidrólise dos benzofenóis (Salvador, 1989).

Shih-Hsiung Wu (1999) investigou as potências do forno de microondas em diferentes tempos de hidrólise do ácido colominico em forno de microondas, exaltando como vantagens na utilização do forno de microondas: obtenção de produtos com baixo grau de polimerização, menor observação de produtos

secundários e maior rendimento na hidrólise em relação ao método convencional de proteínas e peptídeos.

Devido ao forno de microondas ser uma caixa onde as microondas são lançadas com desordem, há necessidade de se determinar a potência em regiões diferentes regiões do forno, padronizando-se, assim, apenas um determinado local para uso. Utilizando-se uma certa quantidade de água e verificando a temperatura nos três níveis de potência do forno é possível determinar a potência no centro do forno com base na variação da energia térmica em função do tempo (De Paula, 2001). Os resultados obtidos por De Paula (2001) foram semelhantes aos de La Guadia, (1993) na determinação da potência no interior do forno.

Malviya (2003) utilizou o forno de microondas para metilação de polissacarídeos vegetal, após purificação e isolamento da goma Guar de *Cyamopsis tetragonolobus* (Guar).

A metilação do polissacarídeo usando o forno de microondas, em 100% de sua potência total, durante 4 minutos foi suficiente para introduzir os radicais metil nos polissacarídeos (Malviya, 2003).

O forno de microondas também é utilizado como fonte aquecedora para facilitar a hidrólise completa da goma guar em metil monossacarídeos, com apenas 1,66 minuto e potência de 70% da capacidade do forno de microondas, demonstrando a presença de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manose, 2,3-di-O-metil-D-manose e 2,3,6-tri-O-metil-D-manose nas respectivas proporções 1,00:1,01:1,02 molar (Thibault, 1999). Thibault (1999), usando forno de microondas com uma potência de 750W, sob diferentes tempos e condições, desenvolveu a esterificação em cristais de celulose para fabricação de plásticos biodegradáveis.

Estes plásticos podem ser utilizados em embalagens de produtos alimentícios, sob condições livres de solventes durante a catálise. Após a esterificação da celulose o plástico obtido teve as seguintes características: transparente, claro, flexível, de pequena espessura.

O forno de microondas tem participação com absoluto sucesso em reações de hidrólise. Estas reações são de grande interesse do ponto de vista prático para tecnologia da indústria química. As reações de N-acetilação também são possíveis de acontecer sob a irradiação de microondas. Yuri (1999) testou soluções de amins tal como: p-anisidine e benzilamina com ácido acético a 80% e sujeitas à irradiação por alguns minutos em um forno de microondas. Os produtos N-acetil foram obtidos com elevados rendimentos e com um bom grau de purificação. Esta reação foi estendida usando o ácido propiônico e o ácido butírico em substituição ao ácido acético e também as amins foram substituídas e obteve-se o mesmo sucesso.

As pterinas foram isolados pela primeira vez em pigmentos da asa de borboletas européias (Lepidóptera), quase todos os produtos naturais do pteridine são acompanhados com ácido fólico, biopterin, neopterin, assim como metotrexato, droga sintética usada contra câncer possuindo uma substituição no carbono 6 (C-6) do anel pteridine. Houve um grande interesse em desenvolver síntese de regiões específicas das pterinas a fim de priorizar as preparações destas moléculas complexas. No trabalho foi realizada a síntese de região específica para conveniente substituição no carbono seis das pterinas. Assim como das quinoxalinas, usando o forno de microondas para reação de conjugação, em ambos os elementos (Adak, 2002).

O forno de microondas mais uma vez mostra-se uma importante ferramenta na aceleração do processo, reduzindo o tempo de reação, tornando o método mais simples e específico na região do C-6 para síntese de pterinas e também nos heterociclos da quinoxalina (Adak, 2002).

Um fato comum nos trabalhos sobre a utilização do forno de microondas para as diversas funções é a redução no tempo de reação. Observa-se que, assim como foram constatados por De Paula (2001) nos demais, 5 minutos ou menos no forno foram sempre suficiente para realização das reações.

2.5 OLIGOSSACARÍDEOS

Z. mobilis cresce em meio de sacarose e converte este açúcar em glicose e frutose pela ação de até três enzimas: a levanassacarase extracelular (Lev U) formando oligossacarídeos, levana e glicose; uma invertase extracelular (Inv B) formando glicose e frutose; e uma outra invertase (Inv A) cujo papel ainda não foi totalmente esclarecido. É ainda formado, outro subproduto, o sorbitol, quando as células usam sacarose como fonte de carbono. A formação de todos esses subprodutos conduz a uma expressiva redução na produção de etanol (Preziosi et al, 1990; Yanase et al., 1992).

Considerando-se que a produção de levana e de oligossacarídeos ocorrem simultaneamente no metabolismo da sacarose por *Z. mobilis*, e que a mesma enzima, a levanassacarase, é responsável pelo processo de polimerização de ambos, entende-se que fatores que afetam a cinética enzimática, tais como

temperatura e concentração de substrato, influenciarão no tamanho da cadeia polimérica formada (Coimbra, 2002).

Os frutooligossacarídeos são polímeros naturais de frutose que usualmente são encontrados ligados a uma molécula inicial de glicose. Os frutooligossacarídeos podem ser produzidos comercialmente por uma ação enzimática sobre a sacarose (Hidaka e cols., 1986).

Um grupo específico de oligossacarídeos tem atraído interesse comercial, são os frutooligossacarídeos (FOS), os quais são produzidos tanto por plantas, como trigo, centeio, cebola, alho, banana, alface, chicória (Likardi et. al 2001) quanto por microorganismos. Entre os microrganismos produtores é possível citar *Aureobasidium pullulans*, *Aureobasidium sp*, *Arthrobacter sp*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Claviceps purpurea*, *Fusarium oxysporum*, *penicillium spinulosum*, *Saccharomyces cerevisiae* (Yun, 1996), além de *Zymomonas mobilis* (Viikari & Linko, 1986).

Berkers et al., (2002) realizou a investigação da estabilidade dos frutooligossacarídeos derivados do complexo levana-levanassacarase. Os oligossacarídeos foram extraídos pela adição do etanol a 96% em uma proporção de 2,5:1 etanol/solução, agitando-se durante 10 minutos em temperatura ambiente. A dinâmica da conversão da sacarose em glicose, frutose e frutooligossacarídeo formados pela levassacarase extracelular, demonstraram que a frutose exibe um ápice durante as primeiras 6 horas e depois deixa de variar, enquanto a concentração de glicose apresentou uma variação linear durante as 24 horas de incubação. Ambos, frutooligossacarídeos e levana, são

considerados como alimentos funcionais, que atuam como fatores prebióticos, reduzindo os níveis de colesterol no sangue (Bekers et al., 2002).

A obtenção de oligossacarídeos derivados da hidrólise de levana demonstrou uma série de (2_6) β _D fructofuranose com DP 14 em análise no GPC BIO Gel P2.

Os oligossacarídeos são formados por ligações glicosídicas através de uma reação de condensação entre o grupo hidroxila do átomo de carbono anomérico de um monossacarídeo e grupo hidroxila de um outro monossacarídeo formando um grupo acetil.

Atualmente, a classificação de oligossacarídeos é feita de acordo com o número de monossacarídeos, presentes na cadeia, como exemplo: di, tri e tetrassacarídeos. Os oligossacarídeos ainda são subdivididos em duas classes, em homo e hetero-oligossacarídeos. Os homossacarídeos consistem apenas de um único tipo de monossacarídeos. Enquanto os hetero-oligossacarídeos consistem de um ou mais oligossacarídeos diferentes. Os frutooligossacarídeos são homossacarídeos constituídos apenas por monômeros de frutoses. (Kennedy et. al., 1985).

Os frutooligossacarídeos são totalmente resistentes à digestão no trato gastrointestinal superior e utilizados quase inteiramente pelas bifidobactérias no cólon (Hidaka et. al., 1986).

Os frutooligossacarídeos são de 0,4 a 0,6 vezes mais doces que a sacarose. Como não são absorvidos pelo organismo, representam um alimento seguro para uso em pessoas com diabetes (Yun, 1996). Estima-se que eles

forneçam apenas 1 Kcal/g (Robertfroid et. al., 1993). Relata-se também que seu consumo habitual, intensifica o crescimento da flora intestinal, aliviam a constipação e o suprimindo a produção de substâncias putrefativas (Yun, 1996).

Trautwein et. al. (1988), utilizando um tipo de camundongo, relataram que frutooligossacarídeos de inulina exercem um efeito hipocolesterolêmico. A evidência sobre o efeito dos frutooligossacarídeos nos lipídeos sanguíneos humanos é conflitante. Alguns estudos (Jenkins et. al., 1991) relataram concentrações elevadas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), possivelmente devidas à produção de acetato, um precursor de colesterol e lipídeos, pela fermentação intestinal. A ação de diminuição dos lipídeos por frutooligossacarídeos parece envolver alterações na síntese de triglicérides hepáticas, secreção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) ou reabsorção de sais biliares. O consumo habitual de frutooligossacarídeos altera o metabolismo da glicose. Luo et. al. (1996) relataram que 20g de frutooligossacarídeos diários diminui a produção de glicose hepática basal comparada à sacarose em seres humanos saudáveis.

Os frutooligossacarídeos são considerados componentes alimentares polifuncionais devido a inúmeras propriedades benéficas. Eles funcionam como fatores probióticos estimulando o crescimento e a atividade de bactérias da flora intestinal, especialmente dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, mantendo o equilíbrio de microflora e afastando a colonização e crescimento de microrganismos patogênicos (Yun, 1996).

Outras propriedades importantes destes oligossacarídeos foram relatadas. Eles são livres de calorias, pois são escassamente hidrolisados por enzimas

digestivas e, portanto, não são utilizados como fonte de energia. São também não cariogênicos. Seu sabor doce é muito similar ao da sacarose, um adoçante tradicional. Estas peculiaridades indicam seu uso como adoçante em resposta a um aumento da demanda, sobretudo de diabéticos, por serem alimentos de baixa caloria (Yun, 1996).

A presença de oligossacarídeos e monossacarídeos no mel brasileiro é um reflexo das condições do clima da região e da vegetação nas proximidades das áreas de produção. É constituído por diversos mono e oligossacarídeos em diferentes concentrações. A sacarose, por exemplo, devido a reação de trans_D_glicosilação o qual é iniciada pela transferência de unidade de D_glicopiranosil para uma molécula receptora que pode ser um mono-, oligo- ou polissacarídeo, mostra-se presente em maiores concentrações no mel nas regiões Sul e Sudeste do Brasil que nas demais regiões. A formação de oligossacarídeos no mel seria principalmente devido as reações de trans_D_glicosilação (Bastos, 2002).

Palatinose, um adoçante de origem natural ou sintética constituído de glicose e frutose e vários oligossacarídeos tais como isomaltoligossacarídeos e frutooligossacarídeos têm surgido como adoçante alternativo devido a uma demanda por alimentos de baixa caloria. Entre eles, os frutooligossacarídeos microbianos obtidos de sacarose tem atraído especial atenção. Isto se deve à elevada resistência dos frutooligossacarídeos à hidrólise ácida e enzimática (Yun, 1996; Roberfroid, 1997). Marx et al. (2000) determinaram a resistência de frutooligossacarídeos com ligações do tipo $\beta_{(2,6)}$ às enzimas do

tratogastrointestinal superior. Eles realizaram um teste de digestão in vitro incubando uma série de amilases, proteases, pancreatina e tripsina com os frutooligossacarídeos e posteriormente analisaram a mistura, antes e depois da hidrólise, por cromatografia líquida. Eles verificaram que os frutooligossacarídeos de cadeia longa são mais resistentes a hidrólises ácida ou enzimática do que os cadeias curtas, demonstrando que eles atingem o cólon inalterados servindo como substrato para microrganismos intestinais.

O método de cromatografia líquido de alta eficiência tornou-se um dos métodos mais utilizados na análise de mono e oligossacarídeos produzidos por via fermentativa ou através de hidrólises de polímeros com elevados pesos moleculares. O'Neill (1995) analisou a composição de monossacarídeos resultantes de hidrólises de oligossacarídeos e glicoproteínas em HPLC, confirmando em seu trabalho a eficácia e eficiência do método. Foi realizada uma comparação com TMS, separação por trimetilsilil em cromatografia líquido-gás, um método de difícil interpretação dos resultados. Foram submetidos a hidrólises diferentes tipos de oligossacarídeos e glicoproteínas a 121°C durante duas horas. Os intervalos de tempos de hidrólises testados foram de uma a seis horas, ocorrendo na maioria das amostras às hidrólises totais a partir das duas primeiras horas e uma constante no decorrer do tempo (O'Neill, 1995).

O FOS conhecido pelo nome comercial de Neosugar é uma mistura de frutooligossacarídeos desenvolvido, no Japão, originalmente como adoçante de baixa caloria, não-nutritivo. O Neosugar é comercializado em forma de xarope ou de pó pela Seika Kaisha Lida do Japão. Trata-se de uma mistura de 1-(1-β-

frutofuranosil) $n-1$ sacarose oligômeros, nos quais n pode variar de 2 a 4. Basicamente, são moléculas de sacarose (dissacarídeo glicose-frutose) aos quais foram acrescentadas 1, 2 ou 3 unidades adicionais de frutose por ligação glicosídica β (2 \rightarrow 1) às unidades de frutose da sacarose. Esses compostos apresentam propriedades físicas que os tornam aplicáveis em produtos alimentícios, como ausência de cor e de odor, estabilidade em pH neutro e em temperaturas inferiores a 140°C (Torres et. al 2001).

3.0 OBJETIVO GERAL

Obter, por hidrólise ácida em forno de microondas, frações de levana de baixo peso molecular e frutooligossacarídeos a partir do polissacarídeo produzido por via fermentativa.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Padronizar condições de hidrólise em forno de microondas que levem à obtenção de frações de levana de baixo peso molecular médio, oligossacarídeos e monossacarídeos;
2. Obtenção de frações de levana de baixo peso molecular não encontradas na produção por via fermentativa;
3. Definir a fração de peso molecular médio mais adequada dentre as frações de levana hidrolisadas, para uso antitumoral;
4. Caracterizar os oligossacarídeos obtidos no processo de hidrólise segundo o grau de polimerização, por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FRACIONAMENTO DA LEVANA POR PRECIPITAÇÃO

Para o estudo do fracionamento de levana por precipitação foram pesados 2,5g da levana nativa liofilizada, a qual foi solubilizada em um volume de água destilada, suficiente para se conseguir uma concentração de 100g/L. A essa solução foi adicionada quantidade adequada de etanol absoluto, agitando-se sempre, para obtenção de uma concentração de 10% (p/p) em etanol.

A mistura etanol, água e levana foi deixada em repouso a 4°C por um período de 03 a 05 dias, para que a fração de levana sedimentasse. Ocorrida a decantação, o sobrenadante foi retirado e a ele adicionado um volume de álcool suficiente para elevar a concentração a 20% de etanol (p/p). Os precipitados obtidos por decantação foram transferidos para pesa-filtros tarados a 50°C e levados para secar em estufa à vácuo (Modelo FANEM) a mesma temperatura. O mesmo procedimento foi adotado para obtenção das frações subseqüentes, em intervalos de 10 em 10 até 90% de etanol (p/p).

4.2 FRACIONAMENTO ACELERADO POR CENTRIFUGAÇÃO

A primeira etapa foi realizada da mesma forma que a anterior, porém a mistura etanol, água e levana foi levada para centrifuga (Sorvall Super T21) refrigerada a 4°C a 5000 rpm durante 35 minutos, para separação da fração a 10% de levana (mais pesada). Ocorrida a centrifugação, o sobrenadante foi

retirado e a ele adicionado um volume de álcool suficiente para elevar a concentração a 20% de etanol (p/p). A centrifugação repetida nas mesmas condições anteriores. O precipitado obtido foi transferido para pesa-filtros secos a 50°C, tarados e levados para estufa a vácuo nesta mesma temperatura, para secagem da fração centrifugada. O resíduo foi seco até peso constante. Assim, foram obtidos os pesos das frações de levana precipitadas nas diferentes concentrações de etanol, ou seja, 10 – 20 – 30 – 40 – 50 – 60 – 70% p/p.

4.3 FRACIONAMENTO DA LEVANA POR PRECIPITAÇÃO - após hidrólise ácida em forno de microondas.

A solução de levana destinada à hidrólise foi obtida da mesma forma que a solução destinada ao fracionamento. A essa solução foi adicionada quantidade de ácido clorídrico 0,1M até atingir o pH de 2,5, em seguida foi levada ao forno de microondas, White – Westnghouse modelo 3500B, para que ocorresse a hidrólise ácida por 3 minutos. Posteriormente foi adicionada quantidade adequada de etanol absoluto, agitando-se sempre, para obtenção de uma concentração de 10% (p/p) em etanol.

A mistura etanol, água e levana foi submetida ao mesmo procedimento do item 4.1.

4.4 HIDRÓLISE ÁCIDA DA LEVANA.

Visando uma maior rapidez e controle sobre a quebra das ligações da levana, por hidrólise ácida, foi utilizado um forno de microondas como fonte aquecedora para obtenção de oligossacarídeos. Para isso, foi preparada uma solução de levana 20g/L a partir de material liofilizado. O pH desta solução foi ajustado para 2,5 com ácido clorídrico 0,1M. Esta solução foi hidrolisada em forno de microondas com potência de 650W, durante os seguintes tempos: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 5,0 minutos.

Após a hidrólise, as amostras foram neutralizadas com soluções de NaOH.

4.5 FRACIONAMENTO DE LEVANA – Sem uso de centrifugação após hidrólise em forno de microondas.

A solução de levana foi adicionada quantidade de ácido clorídrico 0,1M até atingir o pH de 2,5, em seguida foi levada ao forno de microondas para que ocorresse a hidrólise ácida por 3 minutos. Posteriormente, foi adicionado etanol absoluto suficiente para obtenção de uma concentração de 95% (p/p) em etanol. A mistura etanol - água - levana foi deixada em repouso a 4°C por período de 35 minutos, para que a levana sedimentasse. Ocorrida à decantação, 200mL do sobrenadante foi retirado para evaporação do excesso de etanol a 50°C. Após a evaporação do etanol, o material seco foi solubilizado em água e levado para análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.6 ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS

A análise de oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência. A fase móvel foi água deionizada, a coluna foi uma REZEX-RS0 OLIGOSACCHARIDE (12 μ m x 10mm x 200mm) e a temperatura do forno foi de 80°C. A detecção foi realizada por índice de refração com a unidade ótica mantida a 35°C. Foi utilizado um padrão qualitativo de oligossacarídeos (Light corn syrup – Order No. ALO-3038).

4.7 ANÁLISE DE MONOSSACARÍDEOS

A análise dos monossacarídeos foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência. A fase móvel foi água deionizada e a coluna BECKMAN U-SPHEROGEL CARBOHYDRATE (10 μ m x 6,5mm x 300mm) e a temperatura do forno foi 80°C. A detecção foi realizada por índice de refração com a unidade ótica mantida a 35°C. Foi preparada uma solução com um padrão de frutose (D-Frutose – VETEC No. 374).

4.8 TESTES ANTITUMORAIS

4.8.1 ENSAIO BIOLÓGICO

Foram utilizados para os ensaios antitumorais camundongos albinos suíços, variedade *Mus musculus*, com cerca de 60 dias de nascidos, pesando de 20 a 30g, pertencentes ao biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE. Para o transplante do tumor sólido sarcoma 180, a massa tumoral foi retirada de um animal doador, fragmentada e colocada em solução antibiótica. O fragmento tumoral de cerca de 3mm de diâmetro foi inoculado subcutaneamente (s.c) na região axilar do animal (Stock et al., 1955; Komiyama & Fmayama, 1993).

4.8.2 TESTES DE INIBIÇÃO TUMORAL

Todos os testes de inibição tumoral foram realizados de acordo com o descrito a seguir. Cada conjunto de experimentos foi desenvolvido empregando-se grupos de 06 animais para cada fração testada. Foram incluídos em cada ensaio, um grupo controle, correspondente aos animais transplantados mas sem tratamento. A quimioterapia experimental teve início 48h após o implante do tumor. Os polissacarídeos foram dissolvidos em solução salina estéril e aplicados diariamente, por sete dias, por via intraperitoneal, com dose de 200mg/Kg de peso do animal de acordo com o descrito por Calazans (1997). Ao término do tratamento, os animais foram sacrificados, os tumores retirados, dissecados e

pesados. O mesmo procedimento foi feito no grupo controle. As inibições tumorais foram calculadas segundo a fórmula descrita por Machon et al., (1981).

$$TWI\% = C - T / C \times 100$$

Onde: TWI% = % de inibição tumoral;

C = Média dos pesos dos tumores doa animais controle;

T = Média dos grupos testados.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS DE BIOSSEPARAÇÃO

Através de precipitação fracionada, foi construído um histograma de distribuição de frações de diferentes faixas de pesos moleculares médios existentes na levana nativa. As precipitações das frações ocorrem após adição crescente de etanol por decantação durante 3 a 5 dias sob refrigeração. As novas condições do fracionamento consistiriam na redução do tempo de precipitação das frações. Submeteu-se, cada fração da levana durante o processo de precipitação, à ultracentrifugação, acelerando a precipitação e, conseqüentemente, reduzindo o tempo de construção do histograma de distribuição.

As Figuras 1 e 2 mostram a distribuição das frações da levana nativa produzida por via fermentativa, obtidas pelo método de precipitação fracionada com adição crescente de etanol. As precipitações foram realizadas sem e com o uso de uma ultracentrífuga.

Na Figura 1 observa-se o histograma de distribuição de frações de diferentes pesos moleculares médios, existentes na levana produzida por via fermentativa (levana nativa).

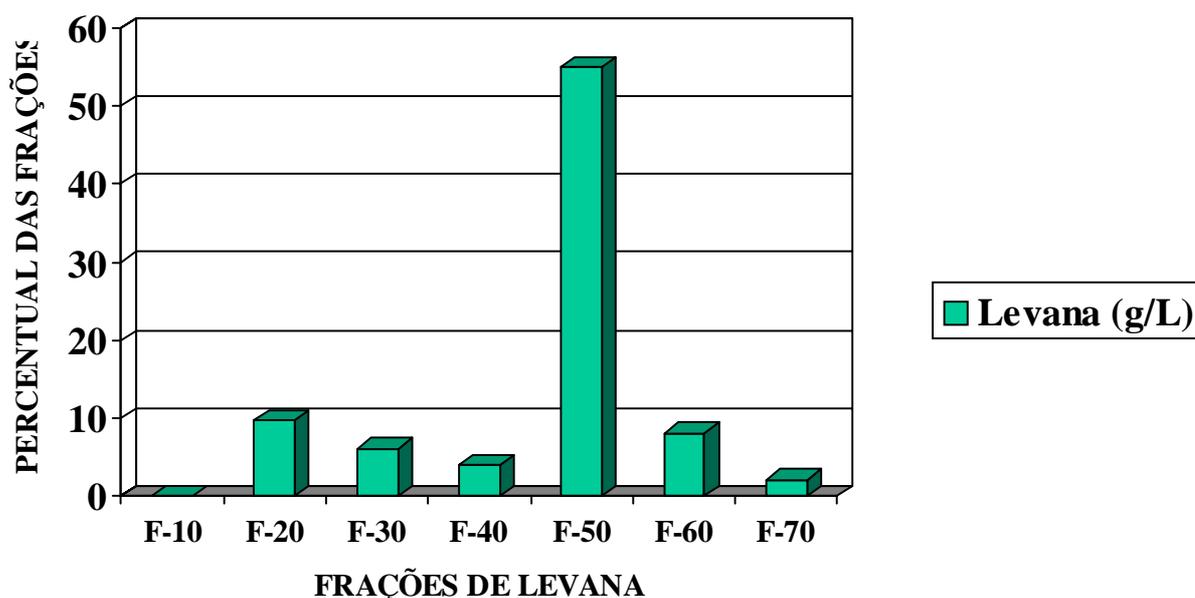


Figura 1. Histograma de distribuição de frações mássicas de levanas produzida por *Z. mobilis* ZAG 12, obtidas pelo método de precipitação fracionada.

A Figura 2 mostra o histograma de distribuição da levana nativa submetida ao fracionamento utilizando uma ultracentrífuga para acelerar o processo de precipitação das frações. Com esta modificação da técnica original foi possível reduzir o tempo de obtenção destas frações e agilizar a construção do histograma de distribuição. Com a utilização da ultracentrífuga, o tempo de um histograma que era de aproximadamente 30 dias, foi reduzido para 7 horas de trabalho. O tempo de centrifugação de cada fração foi de apenas 35 minutos. No método utilizado anteriormente, gastava-se de 3 a 5 dias para obtenção de uma única fração.

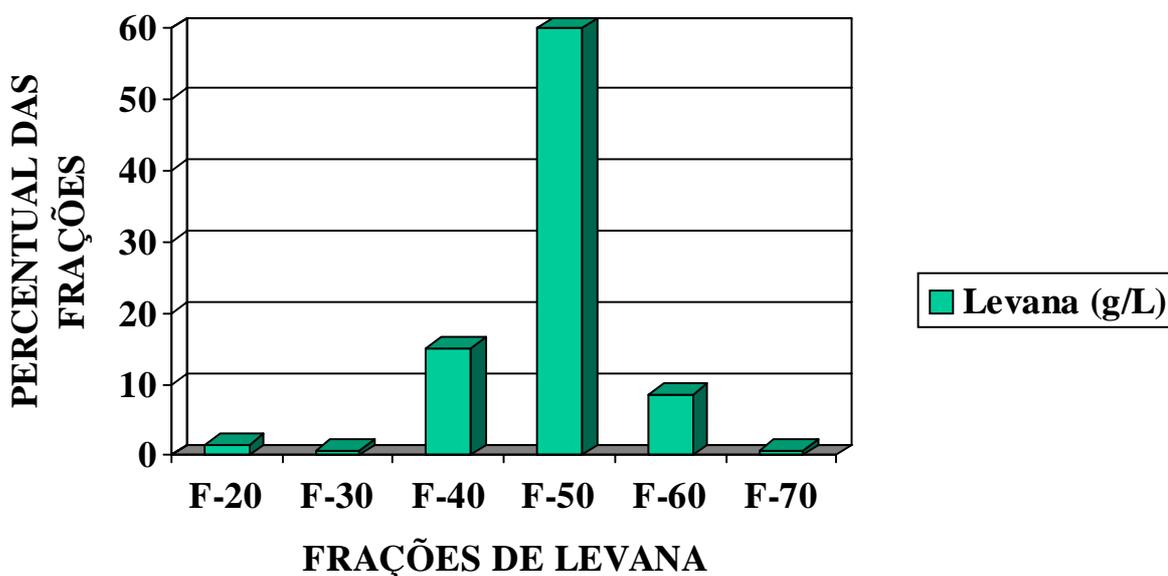


Figura 2. Histograma de distribuição de frações mássicas de levanas produzida por *Z. mobilis* ZAG 12, com o uso da centrifuga para separação das diferentes frações.

Comparando-se os histogramas, Figuras 1 e 2, observa-se a grande similaridade existente entre ambos confirmando-se a validade do emprego da centrifugação para aceleração da separação das frações. Pequenas alterações na quantidade de algumas frações recuperadas são observadas. O histograma de distribuição das frações de levana submetida ao processo de centrifugação, apresenta-se como uma curva no formato gaussiano, gerando um histograma semelhante ao original (levana nativa).

Foram testados progressivos tempos de centrifugação até atingir-se o mais adequado para separação das frações. Cada fração foi submetida à centrifugação, variando-se os tempos de 10 a 45 minutos, com intervalos de 5 minutos. As frações mais pesadas (F-20 e F-30) e as intermediárias (F-40 e F-50) foram precipitadas somente com 30 minutos de centrifugação. Constatou-se que 35

minutos era o tempo ideal para separação das frações, pois aumentando-se o tempo para 45 minutos não registrou-se variações quantitativas, mesmo nas frações mais leves do histograma.

Foi testado também o uso da ultracentrífuga numa solução de levana, após hidrólise ácida. Devido aos reduzidos pesos moleculares adquiridos pelas frações depois da hidrólise, não foi possível a separação das frações mais leves.

Sabe-se que o crescimento das cadeias poliméricas ocorre aleatoriamente e que o peso molecular médio final do polímero nativo sofre influência de alguns fatores da produção como, por exemplo, a linhagem do microrganismo utilizado e as condições de fermentação. Em consequência, tem-se uma variação na distribuição destes pesos moleculares médios, o que, em última análise, irá influenciar as características da curva de distribuição de determinado polímero (Calazans, 1997).

5.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PESO MOLECULAR NA RESPOSTA ANTITUMORAL

A levana total produzida por via fermentativa apresenta frações pesadas e frações leves de acordo com os histogramas de distribuição de frações traçados (Figura 1). A literatura relata que diferentes frações de levana apresentam diferentes atividades antitumorais contra os tumores experimentais, carcinoma de Erhlich e sarcoma-180 (Lima, 2001). Diante de tais resultados, foi realizado o estudo sobre a inibição tumoral em relação aos pesos moleculares ponderais

médios entre 7.900 e 720.200. Os quais apresentaram variação entre 60 e 84% nos percentuais de inibição tumoral contra o sarcoma 180.

Com base nos resultados obtidos por Calazans (1997) e Lima (2001), procurou-se ampliar o estudo, obtendo-se novas faixas de pesos moleculares, buscando a fração que resultem na maior inibição dos tumores sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich.

Usando-se forno de microondas, foi possível obter as frações F-60 e F-70 em torno de 900mg, quantidades suficientes para os testes antitumorais. Nos experimentos realizados, as frações F-60 e F-70 apresentaram resultados acima de 50% de inibição contra os tumores testados. No entanto, a F-60 apresentou uma inibição do crescimento tumoral contra o sarcoma 180 de, aproximadamente, 77% ($p < 0,025$) e apenas 34% ($p < 0,0025$) para o carcinoma de Ehrlich. Enquanto a F-70 apresentou uma inibição de crescimento tumoral contra o sarcoma 180 de 57% ($p < 0,025$), e de 79% ($p < 0,025$) contra o carcinoma de Ehrlich (De Paula, 2001).

Com a obtenção de faixas de pesos molecular mais leves, obtidas por hidrólise em forno de microondas, ampliou-se a investigação relativa à influência dos pesos moleculares de levanas no uso clínico. O fracionamento das amostras submetidas à citada hidrólise possibilitou tanto a obtenção em maior quantidade de determinados pesos moleculares, quanto à aquisição de novas frações, não existentes no histograma de distribuição da levana original.

O uso do forno de microondas para obtenção de tais frações não compromete a molécula quimicamente, apresentando-se semelhante aos açúcares submetidos a hidrólise em banho-maria (Li Betty, 1998). A mesma

preocupação foi apresentada por De La Guadia (1998), analisando e constatando nenhum tipo de alteração química nas moléculas de aminoácidos obtidos a partir da proteína albumina submetida a hidrólise em forno de microondas.

Das novas frações isoladas, F-80 e F-90, apenas a fração F-80 apresentou resultado significativo para ambos os tumores testados. Foi registrada com essa última uma inibição de 89% ($p < 0,005$) contra o sarcoma 180 e de 58% ($p < 0,005$) contra o carcinoma de Erhlich. A F-90 apresentou uma inibição de apenas 39,5% para o sarcoma 180 ($p < 0,005$) e 56% contra o carcinoma de Erhlich.

As frações F-80 e F-70 foram as que apresentaram os maiores valores de inibição, respectivamente, 89% contra o sarcoma 180 e 79% contra o carcinoma de Erhlich. De acordo com Lima (2001), cada fração possui, dentro de sua faixa de peso molecular médio, uma mistura de espécies que poderão estar presentes nas diferentes faixas testadas, em maior ou menor concentrações, que podem ser as verdadeiras responsáveis pelo efeito final observado.

Segundo os resultados apresentados na Figura 3, contra o sarcoma 180 a maior inibição tumoral ocorrem na aplicação das frações F-60 (77%) e F-80 (89%), e, contra o carcinoma de Erhlich, a maior inibição tumoral foi provocada pelas frações F-70 (79%) e F-90 (65%).

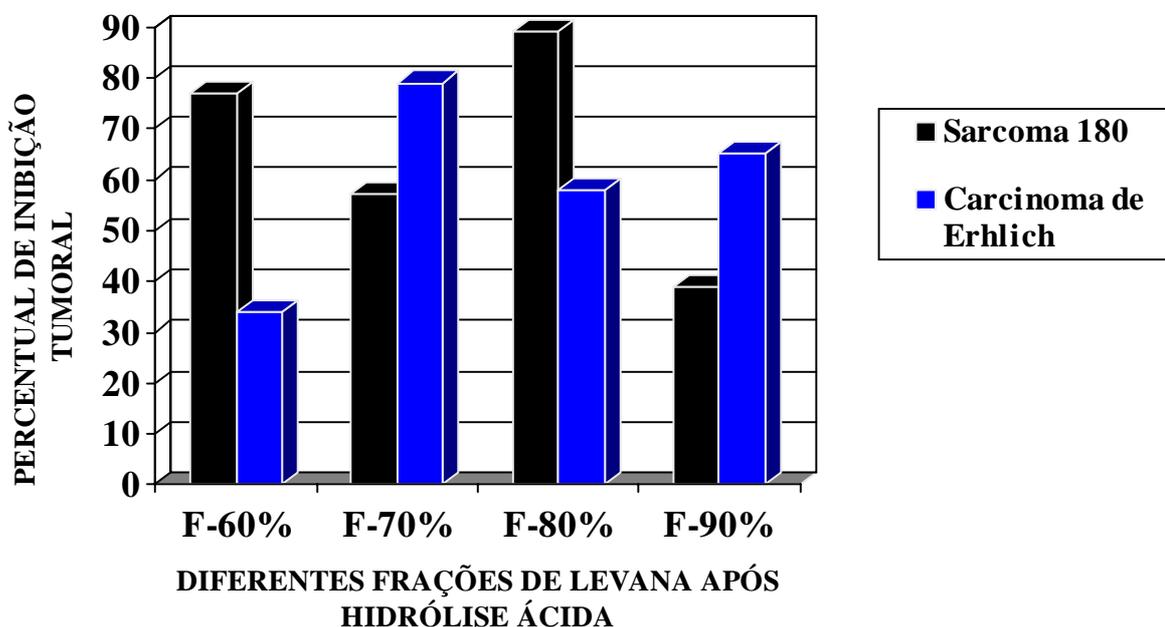


Figura 3. Variação da atividade antitumoral de frações da ZAG 12 contra o sarcoma 180 e carcinoma de Erhlich, em função de diferentes faixas de peso molecular.

O aspecto macrocópico dos tumores após o tratamento com a levana, confirma os relatos de Lima (2001). Os tumores sarcoma 180 apresentaram bordos bem delimitados, poucos invasivos e esbranquiçados, indicando um processo isquêmico, com impedimento do fluxo sanguíneo para a massa tumoral por um processo, provavelmente, de vasoconstrição, provocado pela levana. A semelhança nos resultados aqui apresentados com os da literatura Lima (2001), vem a confirmar a importância do peso molecular na inibição dos tumores. Após o tratamento do tumor sarcoma 180 com diferentes frações, as características do mesmo eram semelhantes entre si, variando o grau de inibição, confirmando a importância do peso molecular no processo de inibição do tumor.

O carcinoma de Ehrlich, após o tratamento, apresentou-se de forma hemorrágica, com aderência entre os vasos e gerando um aspecto mais avermelhado, indicando a possibilidade de diferentes mecanismos de atuação das frações nos diferentes tumores testados, conforme proposto na literatura (Lima, 2001).

A F-90 foi a fração mais leve já obtida pelo método de fracionamento por precipitação com etanol no presente trabalho, delimitando assim, os testes com as frações de levana e conseqüentemente, estreitando cada vez o processo de investigação da fração ideal para inibição total dos tumores.

5.3 OBTENÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA DE LEVANA EM FORNO DE MICROONDAS

Dentre os objetivos deste trabalho esta a avaliação dos frutooligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida de levana em forno de microondas. Foi constatado que a hidrólise total da levana em meio ácido, usando o banho-maria a 100°C são necessárias 2 horas, porém em um forno de microondas, com uma potência de 650W, a hidrólise pode ser realizada em apenas 5 minutos (De Paula, 2001). Visando a obtenção de frações de levana mais leves e oligossacarídeos foram testados tempos de hidrólises variando entre 0,5 e 5 minutos em forno de microondas. O intervalo de 3 minutos revelou-se como o melhor tempo para a produção de oligossacarídeos derivados de levana.

O cromatograma do padrão de oligossacarídeos utilizado apresenta 14 picos de oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização registrados entre

17 e 45 minutos em HPLC. As análises das soluções de levana hidrolisadas demonstraram a existência de oligossacarídeos. Foi possível observar 12 picos de oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização entre 17 e 45 minutos de análise por HPLC. Após 45 minutos foi possível observar picos correspondentes aos mono e dissacarídeos, observados através da injeção de soluções padrão de sacarose, de glicose e de frutose.

Evidenciou-se que o tempo de hidrólise exerce influência tanto na formação de oligossacarídeos com determinado grau de polimerização dos diferentes oligossacarídeos quanto na quantidade destes.

A Tabela 1 apresenta o tempo de hidrólise e o número de oligossacarídeos registrado com diferentes graus de polimerização. A quantidade dos oligossacarídeos esta diretamente relacionada pela área obtida nos cromatogramas. De acordo com os experimentos realizados os oligossacarídeos com DP 14 aparecem com apenas 1 minuto de hidrólise, os de DP 13 e 12 foram obtidos com 1,5 minuto e assim para os demais oligossacarídeos, seguindo uma relação inversamente proporcional entre o tempo de hidrólise e grau de polimerização dos oligossacarídeos, ou seja, quanto maior o tempo de hidrólise menor será o grau de polimerização destes oligossacarídeos.

TEMPO DE HIDRÓLISE (MIN)	Nº DE PICOS DE OLIGOSSACARÍDEOS REGISTRADOS NO CROMATOGRAMA E SEUS RESPECTIVOS GRAUS DE POLIMERIZAÇÃO
1	1 Oligossacarídeo (DP 14)
1,5	2 Oligossacarídeos (DP 13 e 12)
2,5	3 Oligossacarídeos (DP 11, 10 e 9)
3	5 Oligossacarídeos (DP 8, 7, 6, 5 e 4)
4	1 Oligossacarídeo (DP 3)

Tabela 1. Relação entre tempo de hidrólise e a quantidade de picos de oligossacarídeos registrados no cromatograma resultante da hidrólise ácida da levana em forno de microondas.

Cada oligossacarídeo, dependendo do seu grau de polimerização sairá da coluna em determinado tempo de retenção. Os que têm tempo de saída com 41 minutos, correspondem aos oligossacarídeos de menor grau de polimerização. Por exemplo, os oligossacarídeos com DP de 4, que corresponde ao tempo de retenção de 38 minutos, apresentam-se em maior quantidade, traduzido pela maior área no cromatograma, no tempo de hidrólise de 3 minutos.

A Figura 4. apresenta o perfil das áreas de todos os oligossacarídeos registrados nos cromatogramas com picos de saída que variam de 17 minutos considerados como os oligossacarídeos com maior grau de polimerização, até 45 minutos com menor grau de polimerização, com base no padrão de oligossacarídeos usado.

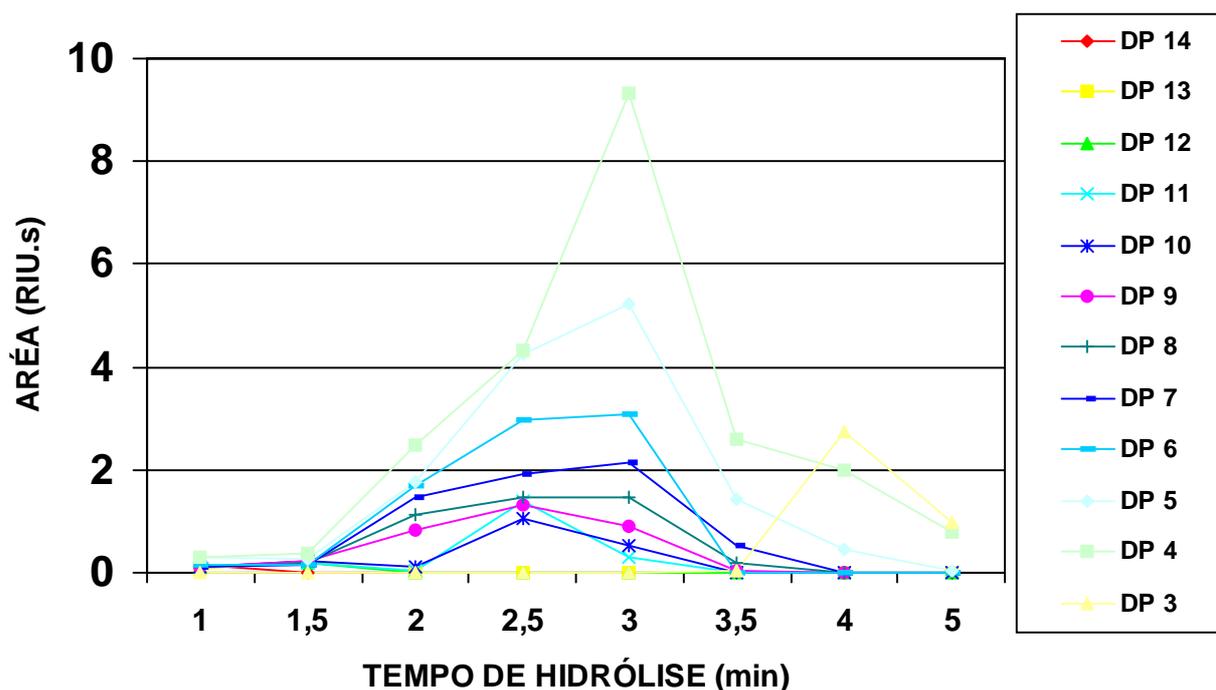


Figura 4. Perfil das áreas relativas às concentrações dos oligossacarídeos com diferentes tempos de saída, nos cromatogramas, em minutos, versus o tempo de hidrólise. Os oligossacarídeos representados na legenda por DP, estão alinhados em ordem crescente de saída aos picos. DP 14 saída com 17 minutos e DP 3 saída com 41 minutos.

Nas Figuras de 5 a 8 estão grafadas as áreas ocupadas por cada oligossacarídeo nos diferentes tempos de hidrólise. De acordo com as estas figuras, observou-se um deslocamento no perfil de concentração dos diferentes oligossacarídeos em função do tempo de hidrólise, com o aparecimento de oligossacarídeos com alto grau de polimerização (Figura 5) e de baixo grau de polimerização (Figura 8).

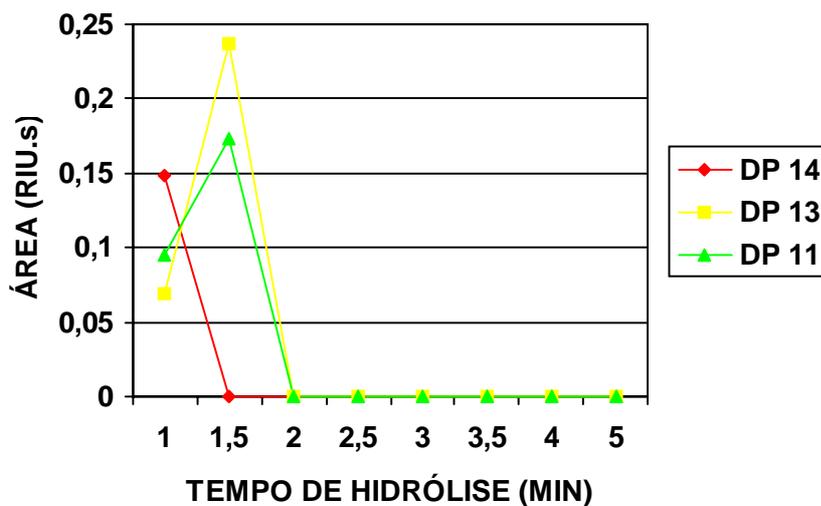


Figura 5 Perfil das áreas relativas às concentrações dos oligossacarídeos com um tempo de saída dos picos em 17, 18 e 19 minutos, relativos aos DP 14, 13, e 12, respectivamente, em diferentes tempos de hidrólise.

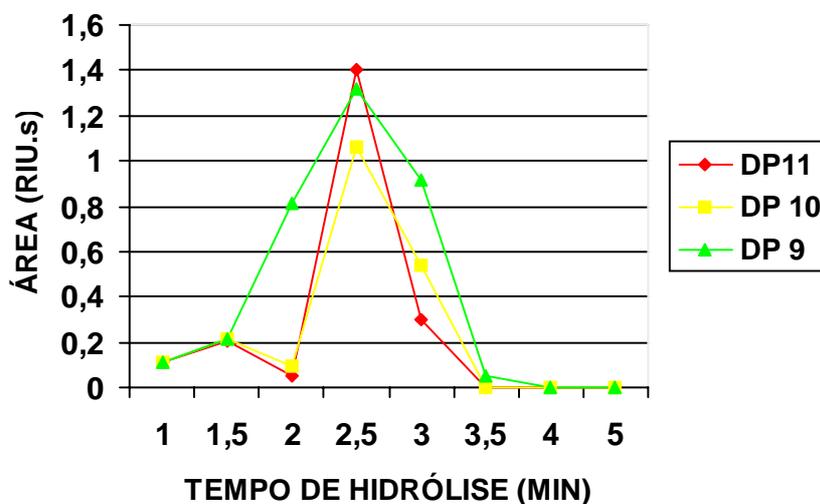


Figura 6. Perfil das áreas relativas às concentrações dos oligossacarídeos com um tempo de saída dos picos 20, 21 e 22 minutos, relativos aos DP 11, 10, e 9, respectivamente, em diferentes tempos de hidrólise.

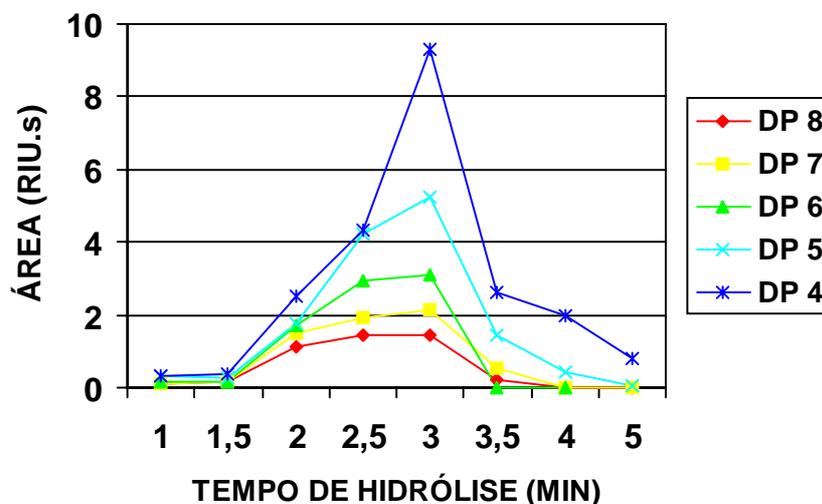


Figura 7. Perfil das áreas relativas às concentrações dos oligossacarídeos com um tempo de saída dos picos em 24, 26, 29, 33 e 38 minutos, relativos aos DP 8, 7, 6, 5 e 4, respectivamente, em diferentes tempos de hidrólise.

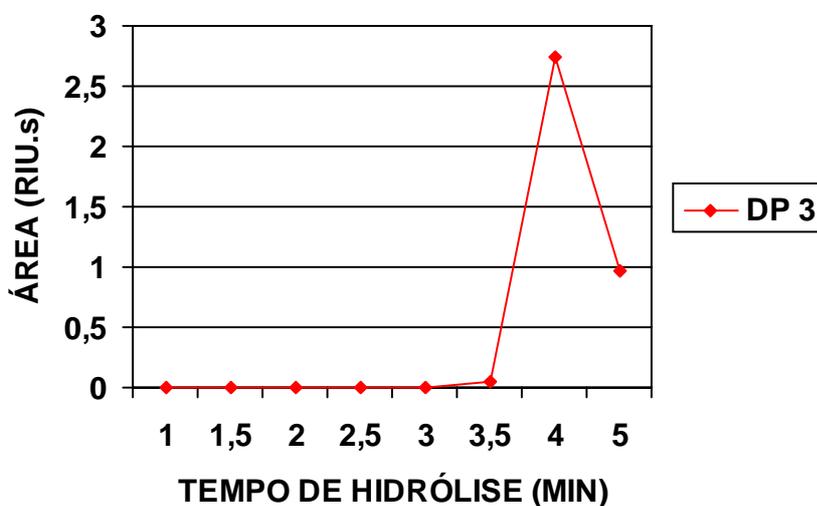


Figura 8. Perfil das áreas relativas às concentrações do oligossacarídeo com um tempo de saída do pico em 41 minutos, em diferentes tempos de hidrólise.

Um estudo cinético da despolimerização da levana na geração de oligossacarídeos seria possível, como mostra as Figuras 5 a 8. Os gráficos

representando os oligossacarídeos demonstram um deslocamento no perfil de concentração no sentido da formação de oligossacarídeos com menores DP com aumento no tempo de hidrólise. Os diferentes graus de polimerização em relação aos tempos de hidrólise demonstram um deslocamento no sentido de um aumento da concentração do oligossacarídeo de menor peso molecular com aumento no tempo de hidrólise.

Cinco minutos de hidrólise em forno de microondas são suficientes para redução completa da levana em monômeros de frutose. O forno de microondas pode se tornar uma importante ferramenta para produção de frutose de forma rápida e econômica.

A eficácia da hidrólise em forno de microondas para obtenção de compostos (polímeros e oligossacarídeos) cada vez menores foi confirmada pela produção crescente de monômeros de frutose com o aumento do tempo de hidrólise nos experimentos realizados (Figura 9).

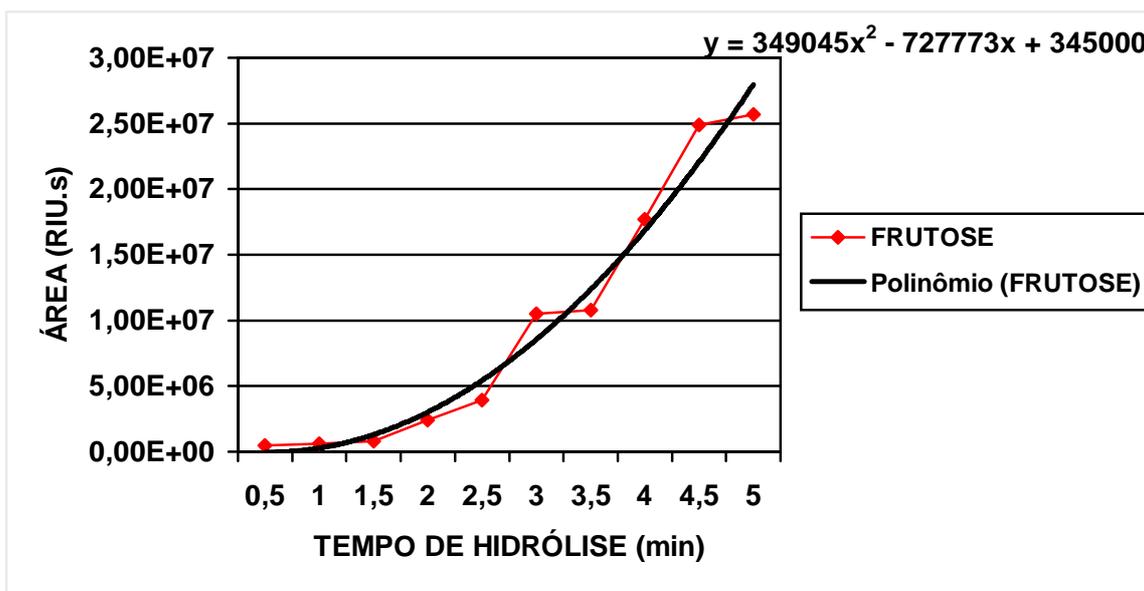


Figura 9. Perfil de concentração de frutose em diferentes tempos de hidrólise.

6.0 CONCLUSÕES

1. A centrifugação pode ser usada como operação auxiliar na construção de histogramas ou curvas de distribuição de polímeros;
2. O banho Maria pode ser substituído pelo forno de microondas na quebra de ligações glicosídicas por hidrólise ácida;
3. A redução considerável no tempo de hidrólise estimula o estudo do emprego de microondas na hidrólise de outros polissacarídeos, além da levana.
4. É possível se obter oligossacarídeos com 1 minuto de hidrólise em forno de microondas. Os resultados indicam que 3 minutos de hidrólise em forno de microondas é o tempo ideal para preparação de oligossacarídeos.
5. A hidrólise completa da levana nativa em monômeros de frutose pode ser realizada com apenas 5 minutos em forno de microondas nas condições aplicadas neste estudo.
6. É viável utilizar-se a hidrólise ácida como método para obtenção de polissacarídeos de baixos pesos moleculares, oligossacarídeos e monossacarídeos a partir de polímeros de alto peso molecular produzidos por fermentação.

7. O uso da hidrólise ácida controlada, em forno de microondas, possibilitou o aumento na quantidade das frações leves (F-60 e F-70) e o surgimento de novas frações (F-80 e F-90) não existentes no histograma de distribuição do polissacarídeo original, confirmando a eficácia desse método para obtenção de frações de baixos pesos moleculares.

8. A produção de novas frações, obtidas por hidrólise em forno de microondas, poderá ser usada para testes farmacológicos, ampliando-se assim as possibilidades de investigações relativas à influência das faixas de pesos moleculares médios no uso clínico.

9. A fração F-80 apresentou maior inibição para o sarcoma 180 enquanto a fração F-70 apresenta maior inibição para carcinoma de Erlich, embora a fração F-90 não apresente inibição significativa para o sarcoma 180.

10. Confirma-se a hipótese de que existem faixas específicas de P.M. que expressam maior atividade antitumoral contra diferentes linhagens de tumores.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, C. A., MOREIRA, R. F. A. Mono e oligossacarídeos no mel APACAME 61, P. 201-207. 2002.

BEKERS, M., LAUKEVICS, J., UPITE, D., KAMINSKA, E., VIGANTS, A., VIESTURS, U., PANKOVA, L., DANILEVICS, A. Fructooligosaccharide and levansucrose producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase., *Process Biochemistry* 38 (2002) 701 – 706, 2002.

BeMILLER J. N. Trends in Industrial Polysaccharides Research, In: Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides, Proceedings of the 3rd International Workshop on Recent Developments in Industrial Polysaccharides: Biomedical and Biotechnological Advances, p. 517-534, Trieste, Italy, Oct. 1988.

BOBBIO F. O. & BOBBIO P. A; Introdução à Química de Alimentos, 2 ed, capítulo I. São Paulo, Varela Ltda. 1989.

BORCHERS, A. T.; STERN, J. S.; HACKMAN, M. R.; KEEN, I. C.; & GERSHWIN, E. M. Mushrooms, Tumors and Immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Vol. 221, No 4, p. 281-293, 1999.

BROCK T. D. & MADIGAN M. T. *Biology of Microorganisms* 6 ed. London, Prentice-Hall International, 1991.

CALAZANS, G. M., RIOS, E. M. et al. Produção de etanol e levana por *Zymomonas mobilis* amostra ZAP em meio de sacarose. Arquivos de Biologia e Tecnologia, 32 (4): 631 – 636, 1989.

CALAZANS, G. M. T. Produção de levana para uso clínico. Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos na Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997. 115p. Tese de Doutorado.

CALAZANS, G. M. T., LOPES, C. E., LIMA, R. M. O. C. & FRANÇA, F. P. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. Biotechnology Letters, 19, 1: 19-21, 1997.

CALAZANS, G. M. T., LIMA, R. C. Et al. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. International Journal of Biological Macromolecules, 27: 245-247, 2000.

CHIHARA, G.; MAEDA, Y.; HAMURO, J.; FUKUOKA, F. Inhibition of Mouse Sarcoma 180 by polysaccharide from *Lentinus endodes* (Berk) Sing. Nature, Vol. 222, May, 1969.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MADA, Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. Antitumour Polysaccharide derived Chemically from Natural Glucan, Pachyman. Nature, Vol. 225, No 285, 1970.

CHIHARA, G. Recent Progress in Immunopharmacology and Therapeutic Effects of Polysaccharides, *Devlop. Biol. Standard.* Vol. 77, pag. 191-197, 1992.

COIMBRA, C. G. °, Relatório de Iniciação Científica, PIBIC, CNPq, UFPE, Recife, PE, 2002.

DAOTIAN FU and ROGER A. O'Neill Monosaccharide Composition Analysis of Oligosaccharides and Glycoproteins by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 227, p. 377-384, 1995.

DAWES, E. A., RIBBONS, D. W., REES, D. A. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. *Biochem J*, 98: 804-812, 1966. Apud: VIIKARI, L., GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas mobilis* – strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 240-244. 1986.

DE PAULA, V. C. Obtenção de levanas de diferentes pesos moleculares, com ação antitumoral. Relatório de Iniciação Científica, PIBIC, CNPq, UFPE, Recife, PE, 2001.

DE PAULA, V. C. Obtenção de levana de diferentes pesos moleculares por hidrólise ainda para uso antitumoral, XL Congresso Brasileiro de Química, Recife, PE, 2000.

DEDONDER, R., NOBLESS, M. Ann. Inst. Pasteur, 85, 356, 1953. Apud: FEINGOLD, D. S. AVIGAD, G. et. al. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. Bioch., v. 64, p. 351-361. 1955.

DE LA GUARDIA M., SALVADOR A., GÓMEZ M. J. & DE BENZO Z. A. Rapid hydrolysis of benzodiazepines to benzophenones in a microwave oven. Analytica Chimica Acta, Amsterdam – Printed in The Netherlands. 224, 123-126. 1989.

DOELLE, H. W. & GREENFIELD, P. F. 1985. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentrations. Applied Microbiology Biotechnology, 22: 411-415.

FEINGOLD, D. S. AVIGAD, G. et. al. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. Bioch., v.64, p. 351-361. 19545.

FRENCH, D. & WILD, G. J. Amer. Chem. Soc., v. 75, p. 2612. 1953. Apud: FEINGOLD, D. S. AVIGAD, G. ET. AL. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. Bioch., v. 64, p. 351-361. 1955.

GABAS, N. & LAGUÉRIE, C. 1992. Batch crystallization of D-xylose by programmed cooling or by programmed adding of ethanol. Chemical Engineering Science, 47, 12: 3148-3152.

GALINDO, E. 1985. Polisacáridos Microbianos. In: Ramirez, R. Q. (ed), Prospectiva de La Biotecnología en México, México, México, Fundación Javier Barros Sierra.

GIBBS, M. & DeMOSS, R. D. (1951) Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*. Archives of Biochemistry and Biophysic. 34: 478-479.

GLAZER, N. & NIKAIDO, H. 1995, Microbial Biotechnology – Fundamentals of Applied Microbiology, 2 ed., New York, W. H. Freeman and Company.

GOSWAMI, S.; ADAK, A. K. The first microwave-assisted regiospecific synthesis of 6-substituted pterins. Tetrahedron Letters 43, p. 8371-8373, (2002).

GOURSON, C.; BENHADDOU, R.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; SAULNIER, L; THIBAULY J. F. Preparation of biodegradable plastic in microwave oven and solvent-free conditions. Macromolecular chemistry C. R. Acad. Sci. Paris, t. 2, Série II c, p. 75-78, 1999.

HAN, Y. W. Microbial Levan, Advances in Applied Microbiology, 35: 171-194, Academic Press, Inc. 1990.

HIDAKA H. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. Bifidobacteria Microflora 5:37, 1986.

HINES, G. E.; MCGHEE, M. & SHURTER, R. A. 1954. Dextran. In: BIXLER, G.H. (edt.), Modern Chemical Process, v. 3, 178-191, New York, Chapman & Hall.

JENKINS D. J. A. Specific types of colonic fermentation may raise low-density lipoprotein cholesterol concentrations. Am J Clin Nutr 43: 141, 1991.

JOERGENSEN, L., THESTRUP, H. N., Determination of Amino acids in Biomass and Protein Samples by Microwave Hydrolysis and Ion-Exchange Chromatography, Journal of Chromatography A, Volume 706, Issues 1-2, pages 421-428, 1995.

KENNEDY, J. F.; STEVENSON, D. L.; WHITE, C. A. & VIKARI, L. The Chromatographic Behaviour of Fructo-oligosaccharides Derived from Levan Produced by the Fermentation of Sucrose by *Zymomonas mobilis*. Carbohydrate Polymers, Elsevier Science Publishers Ltd. Vol. 10, p. 103-113. Elsevier Science Publishers, Ltd. England, 1989.

KOHANYI, G. & DEDONDER, R. C. R. Acad. Sci., n. 233, p. 1142. 1951. Apud: FEINGOLD, D. S, AVIGAD, G. et al. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. Bioch., v. 64, p. 351-361. 1955.

KOMIYAMA, K.; & FUNAYAMA, S. Antitumor Agents, In: The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms. Satoshi Omura (edt.), Springer-Verlag, New York Cap. 5, p. 79-97, 1992.

KULICKE, W. M.; LETTAU, A. I.; THIELKING, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecule structure of different (1-3)- β -D-glucans. *Carbohydrate Research*, vol. 297, p. 135-143, Elsevier Science Ltd., 1997.

LEE, S.; CHOI, S.; KIM, E. & KOO, Y. 1992. Continuous production of clinical dextran using two-stage reactor. *Biotechnology Letters*, 14, 5:379-384.

LEHNIGER, A. L. *Princípios de Bioquímica*, 8 ed., Sarvier Editora, Ltda. São Paulo, 1993.

LEIBOVICI, J. & STARK, Y. Direct Antitumor Effect of the Polysaccharide Levan in Mice Effects of Drug Concentration and Time and Temperature of incubation. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 72, No 6, p. 1417-1420, Jun. 1984.

LEIBOVICI, J. & STARK, Y. Slow Cytotoxicity of the Polysaccharide Levan on Tumor Cells in vitro, *Chem. Biol. Interactions*, vol. 60, p. 191-200, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd., Ireland, 1986.

LI BETTY, W., Comparison of microwave oven and conventional oven for acid hydrolysis of dietary fiber polysaccharide, 1998.

LIKARDI, M. M.; ROSA, O. P. da S.; BUZALAF, M. A. R.; TORRES, S. A. Utilização de frutooligossacarídeo por *Streptococcus mutans* in vitro. *Pesqui Odontol Bras*, v. 15, nº 1, p. 12-17, jan./mar. 2001.

LIMA, N. V. R. Investigação sobre bioatividade de polissacarídeos. 2001 34f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LOBATO, A. V. Produção de oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*. 2003 50f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LUO J. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on inulin-stimulated glucose metabolism. *Am J Clin Nutr* 63: 939, 1996.

MARCH, J. G.; GRASES, F.; SALVADOR, A. Hydrolysis of Phytic Acid by Microwave Treatment: Application to Phytic Acid Analysis in Pharmaceutical Preparations. *Microchemical Journal* 59, No MJ981604, p. 413-416, 1998.

MARGARITS, A. & PACE, G. W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis* *Biotechnology Letters*, vol., 5, p. 345-350, 1985.

MARSHALL, K. and WEIGEL, H. Evidence of multiple branching in the Levans Elaborated by *Streptococcus salivarius* strain 51, Carbohydrate Research, 83: 321-326, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1980.

McCAFFERY, E. L., Laboratory Preparation for Macromolecular Chemistry, McGraw-Hill, 1970.

MORALES-RUBIO, A.; CEREZO, J.; SALVADOR, A.; LA GUARDIA, M. Rapid Acid Hydrolysis of Albumin in a Microwave Oven. Microchemical Journal 47, p. 270-277, 1993.

MOU-CHI CHENG, KUNG-TSUNG WANG, SADAKA INOUE, YASUO INOUE, KAY-HOOI KHOO, and SHIH-HSIUNG WU. Controlled Acid Hydrolysis of Colominic Acid under Microwave Irradiation. Analytical Biochemistry 276, p. 287-293, 1999.

NEUCHL, C.; MERSMANN, A. Fractionation of Polydisperse Dextran using Ethanol, Chemical Engineering Science, vol. 50, nº 6, pp. 951-958, Elsevier Science Ltd. 1995.

OKUDA, T.; YOSHIOKA, Y.; IKEKAWA, T.; CHIHARA, G.; NISHIOKA, K. Anticomplementary activity of Antitumour Polysaccharides, Nature New Biology, vol. 238, Jul. 1972.

PACE, G. W. 1987. Microbial Gums. In: Bu'Lock, J.; Kristiansen, B. (eds), Basic Biotechnolog, chapter 17, Lomdon, Academic Press.

PAWLOWSKI A.; HAMASUR B.; HAILE M.; KALLENIIUS G. & SVENSON S. B. Development of New Techniques for Production of oligosaccharide-protein Conjugate Vaccines; Implications for Development of New Diagnostics and Vaccines Against Tuberculosis. 17182 Solna and Universty for Agricultural Sciences, 75123 Uppsala, Sweden, 2002.

PREZIOSII, L.; MICHEL, G. P. F. & BARATTI, J. 1990^a. Sucrose metabolism in *Zymomonas mobilis*: production and localization of sucrose and levansucrose actives. Canadian Journal of Microbiology = Journal Canadien de Microbiologie, 36: 159-163.

REISS, M., HARTMEIER, W. Levan Production with a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. Food Biotechnology, 4 (1) : 69-75, 1990.

ROBERTFROID, M. B. & DELZENNE, N. M. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. Lebesm-Wiss. U. Technol., v. 27, p. 1-6. 1994.

ROBERTFROID, M. B. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 09, p. 211-219. 1997.

SLODKI, M. E. & CADMUS, M. C. 1979. Production of Microbial Polysaccharides. Adv Appl. Microbiol., 26: 19-54.

RUDIN, A. Polymer Mixtures In: The Elements of Polymer Science and Engineering, Academic Press, Inc. Orlando, Florida USA, Cap. 12 p. 446-449, 1982.

STOCK, C. C et al., Sarcoma 180 inhibition screening data. Cancer Research. Supl. 2: 179-194, 1955.

STRYER, L. Biochemistry, 4th Edition, Cap. 18, p. 463-482, New York, 1996.

SUTHERLAND, I. W. Microbial Polysaccharides – Biotechnological Products of Current and Future Potential, In: Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides, Proceedings of 3rd International Workshop on Recent Developments in Industrial Polysaccharides: Biomedical and Biotechnological Advances, p. 123-132, Trieste, Italy, Oct. 1988.

SUTHERLAND, I. W. Botechnology of Microbial Exopolysaccharides. Cambridge University Press, Cambridge, n.122, p. 141 – 149, 1990.

TAGUSHI, H.; FURNE, T.; KIMURA, 1985, apud FRANZ, G. A.; KRAUS, J. Structure-Activity Relationship of Imune Modulating Polysaccharide with an Antitumor effect. In Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides, Proceedings of 3rd International Workshop on Recent Developments in Industrial Polysaccharides. Biomedical and Biotechnological Advances, p. 241-249., Trieste, Italy, Oct. 1988.

TRAUTWEIN E. A. Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters bile acid profile in hamsters J. Nutr. 128: 1937, 1998.

VANDANA SINGH, ASHUTOSH TIWARI, DEVENDRA NARAYAN TRIPATHI and TULIKA MALVIYA. Microwave promoted methylation of plant polysaccharides. TetrahedronLetters 44, p. 7295-7297, 2003.

VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H.; FABER, E. J.; SMIT, E.; BONTING, M. R.; SMITH, M. R.; BRINK, B. T.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F. G. and DIJKHUIZEN, L. Biochemical and Structural Characterization of the Glucan and Fructan Exopolysaccharides Synthesized by the *Lactobacillus reuteri* Wild-Type Strain and by Mutant Strains. Applied and Environmental Microbiology, July, p. 3008-3014, Vol. 65, No. 7, American Society for Microbiology, 1999.

VIIKARI, L. Carbohydrate Metabolism in *Zymomonas mobilis*, Critical Reviews in Biotechnology, vol. 7, nº 3, p. 237-261. 1988.

VIIKARI, L. 1984a Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 19: 225-252.

VIIKARI, L. 1984b. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 20: 118-123.

VIIKARI, L. & LINKO, M. Rate and yield limiting factors in continuous fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*. Biotechnology Letters, vol. 8, p. 139-144, 1986.

WATANABE, T.; KOBAYASHI, M.; SEGUCHI, M. & MATSUDA, K. 1973. Extracellular polysaccharide from *Escherichia sp* strain nº 1768. Journal of Fermentation Technology, 51, 6: 415-422.

WHISTLER, R.: CORBETT, W. M. Polysaccharides, In: Carbohydrate. Edited by Ward Pigman, p. 641-732, Academic Press, New York, 1957.

WOLFF, I. A.; MELLIES, R. L.; LOHMAR, R. L. et al. 1954. Production of clinical-type dextran. Industrial and Engineering Chemistry, 46, 12: 2605-2610.

YANASE, H.; IWATA, M.; NAKAHIGASHI, R.; KITA, K.; KATO, N. & TOMOMURA, K. 1992. Purification, cristallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biosci. Biotech. Biochem., 56, 8: 1335-1337.

YUN, W. Y. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation, and application. Enzyme and Microbiology Technology, 19: 107-117, 1996.

YURI, P.; HUAROTTE, M.; RUMTHAO, S.; MANHAS, M. S.; BOSE, A. K. Institute of Technology, Hoboken NJ 07030.

PRODUCTION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDES BY LEVAN HYDROLYSIS USING MICROWAVE

V. C. De Paula, I. O. Pinheiro, C. E. Lopes and G. M. T. Calazans.
Laboratório de Processos Fermentativos, Departamento de Antibióticos,
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

SUMMARY

Fructooligosaccharides may be produced by acid hydrolysis of microbial levans. To investigate this reaction levan produced by *Zymomonas mobilis* strain ZAG-12 was used. The hydrolysis was performed in a microwave oven using 20g/L levan solution acidified by hydrochloric acid to pH 2.5. The production of oligomers was confirmed by liquid chromatography. Levan precipitations using ethanol as co-solvent was done to separate the oligosaccharides. The optimum time for oligosaccharides production was 3 minutes.

INTRODUCTION

Polysaccharides are macromolecules composed by hundreds or thousands of monosaccharide joined through glycosidic bounds. On the other hand, oligosaccharides are short chain polysaccharides (Kohanyi & Dedonder, 1951; Dedonder & Noblesse, 1953; French & Wild, 1953; Feingold *et al.*, 1955). Both are readily hydrolyzed in acid solution to yield the constituent monosaccharide. Obviously, oligosaccharides may be obtained from polysaccharides by hydrolysis under conditions that leave the desired oligomer intact for subsequent isolation. Controlled acid hydrolysis results in reaction mixtures from which the oligomers may be obtained. Usually this is done in conditions of low pH and high temperature. Hydrolysis with diluted acid is usually achieved with hydrochloric or sulfuric acid in the concentration range of 0.01 to 2N. If prolonged period of hydrolysis are employed, hydration of the oligosaccharide may occur. Working at water boiling point which is the highest temperature possible under atmospheric pressure the hydrolysis time is of order of hours. So, it is important to develop an alternative method which reduces the hydrolysis time to few minutes.

Fructooligosaccharides are short chain fructans. The interests of food industries on them are due to their functional properties beside than sweetness. Also, they are highly stable in the normal pH range for food (4.0 – 7.0) and at refrigerated temperature over one year (Yun, 1996). Not being digested by the bacteria present in colon, they are used as substitute of sucrose being ideal for diabetics. The production of fructooligosaccharide by hydrolysis of high molecular weight biopolymer using microwave is an alternative route which allows a substantial reduction in hydrolysis time. The oscillatory electromagnetic fields promote the vibration of polar molecules generating heat and the hydrolysis as evidenced by the viscosity decrease and HPLC analysis.

MATERIAL AND METHODS

Levan – Levan ($M_w = 769,500$ and $M_n = 50,100$) produced from *Zymomonas mobilis* ZAG-12 strain in sucrose medium, was used in all experiments.

Hydrolysis – A 20g/L levan solution was prepared and the pH was adjusted to 2.5 using 0.1M hydrochloric acid. The hydrolysis was performed in a microwave oven (White–Westinghouse 3500B) working at 60% of the nominal potency (650 Watts). After hydrolysis the samples were refrigerated and neutralized using a diluted NaOH solution to stop the reaction.

Oligomer separation - The precipitation of the levan was performed by ethanol addition up to 95%. The samples were then rested during 3 to 5 days for levan decantation. The supernatant was withdrawn and subjected to evaporation at 50°C. The dried material was dissolved in water and analyzed in a chromatographer.

Oligomer analysis - The oligomers were analyzed in HP 1100 chromatographer with refractive index detector, the mobile phase was deionised water and the column used was REZEX-RS0 OLISACCHARIDE (12 μ m x 10mm x 200mm).

Monosaccharide analysis – It was analyzed in the same chromatographer with the same mobile phase but the column used was BECKMAN U-SPHEROGEL CARBOHYDRATE (10 μ m x 6.5mm x 300mm). The oven temperature was 80°C in both cases. As standard it was used a light corn syrup – ALO- 3038 and a D-fructose standard nº 374.

RESULTS AND DISCUSSION

The complete levan hydrolysis in a water bath at 100°C occurs in 30 minutes; however, in a microwave oven, the hydrolysis can be performed in 5 minutes only. Several hydrolysis times were tested in a microwave oven to determine the best for levan oligomer production. The analysis of the

hydrolyzed solutions showed the existence of levan oligomers.

The oligosaccharides standard chromatogram revealed the existence of 13 peaks with different degree of polymerization (DP 1, DP 3 – mono and trisaccharide and from DP 4 to DP 14 oligomers) with retention time between 17 and 45 minutes. All the 11 oligomers (from DP 4 to DP 14) present in the standard used were found at the hydrolyzed solutions. The hydrolysis time does affect the number and the amounts of the oligomers and fructose. The 3 minutes hydrolysis resulted in highest oligomers yields. These yields were based on the areas of the peaks. Figure 1 shows the variation in the number of oligomers and the area of fructose versus hydrolysis time. The fructose yields increase with the hydrolysis time. However, the increase in hydrolysis time leads to increase followed by a reduction in oligomers number.

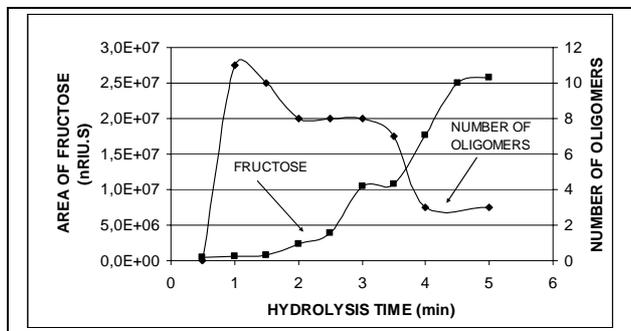


Figure 1 – Relation between area of fructose and the number of different oligosaccharides versus the hydrolysis time.

The Figure 2 exhibit the area versus the different degree of polymerization for the eight hydrolysis times studied.

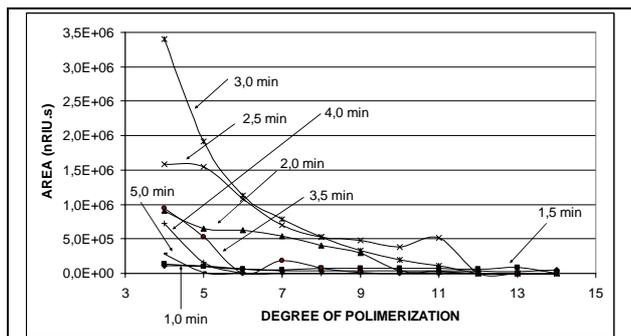


Figure 2 – Relation between the number of different oligosaccharides and the hydrolysis time.

The oligomers with degree of polymerization 4 and 5 are always present for all the hydrolysis time and their areas were the biggest. For all the hydrolysis time, the area decrease with degree of polymerization. The graphic demonstrated the existence of a relationship between the hydrolysis time and oligomers concentrations.

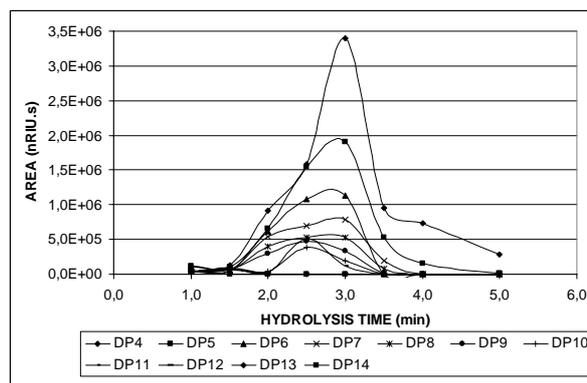
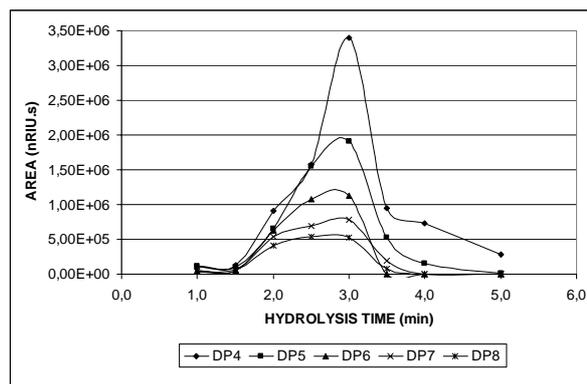
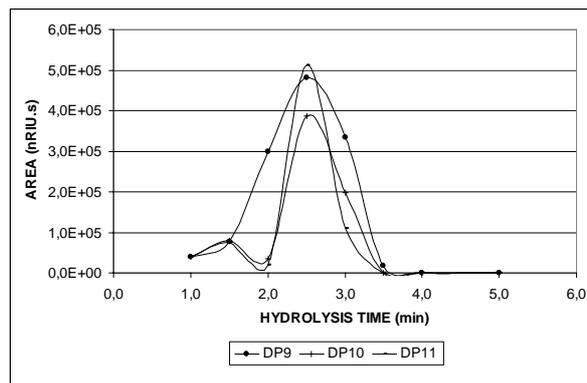
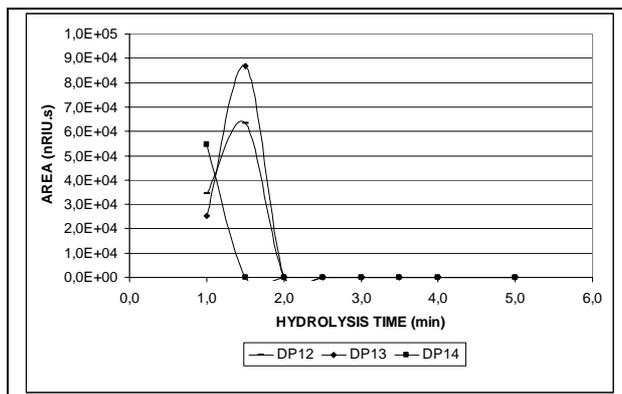


Figure 3 – Behavior of the oligosaccharide (From DP4 to DP14) concentration for different hydrolysis time.

The previous Figures showed the concentration profiles of the different oligomers as function of hydrolysis time. These Figures revealed the formation of oligosaccharides with different polymerization degree. The highest concentration was observed at 3 minutes hydrolysis time.

CONCLUSIONS

The use of microwave oven in glycosidic bonds cracking by acid hydrolysis showed to be viable. It was possible to obtain oligosaccharides in one minute hydrolysis. The results allow the inference that may be useful for all polysaccharides. The acid hydrolysis may be used to obtain the polysaccharides of decreasing molecular weight, oligosaccharides and monosaccharide from high molecular weight polysaccharides from fermentation processes.

The supernatant of the samples subjected to a fractionation after hydrolysis in microwave oven allowed the identification of the oligosaccharides in levan solution proving the method viability and efficacy.

The hydrolysis time interval between 1 and 5 minutes demonstrate coherence in the production of different oligosaccharides due to the peaks areas. The proportionality between hydrolysis times and peak areas were confirmed. As the end of hydrolysis time was increased it become evident the presence of low molecular weight oligomers.

BIBLIOGRAPHY

CALAZANS, G. M. T., LOPES, C. E., LIMA, R. O. C. & FRANÇA, F. P. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, 19, 1: 19-21, 1997.

CALAZANS, G. M. T., LIMA, R. C. Et al. Molecular Weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27: 245-247, 2000.

COIMBRA, C. G. O. Relatório de Iniciação Científica, PIBIC, CNPq, UFPE, Recife, PE, 2002.

KENNEDY, J. F., STEVENSON, D. L., WHITE, C. A. VIİKARI, L. The chromatographic behaviour of a series of fructooligosaccharides derived from levan produced by the fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Carbohydrate Polymers* 10: 103-113, 1989.

YUN, W. Y. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbiology Technology*, 19: 107-117, 1996.