



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112017008976-9 B1**

**(22) Data do Depósito:** 05/11/2015

**(45) Data de Concessão:** 07/02/2023

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO E MÉTODOS DE AUMENTO DA VISCOSIDADE DE COMPOSIÇÕES AQUOSAS, DE TRATAMENTO DE MATERIAL E DE PRODUÇÃO DE DEXTRANO

**(51) Int.Cl.:** C08B 37/02.

**(30) Prioridade Unionista:** 05/11/2014 US 62/075,460.

**(73) Titular(es):** NUTRITION & BIOSCIENCES USA 4, INC..

**(72) Inventor(es):** RAKESH NAMBIAR; RONG GUAN; QIONG CHENG; ROBERT DICOSIMO; JAYME L. PAULLIN; YUANFENG LIANG; CHARLES R. POWLEY; YEFIM BRUN.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2015059261 de 05/11/2015

**(87) Publicação PCT:** WO 2016/073732 de 12/05/2016

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 28/04/2017

**(57) Resumo:** São descritas no presente composições que compreendem dextrano que compreende (i) 87-93% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 6; (ii) 0,1-1,2% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 3; (iii) 0,1-0,7% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 4; (iv) 7,7-8,6% em peso de glicose ligada nas posições 1, 3 e 6; e (v) cerca de 0,4-1,7% em peso de glicose ligada (a) nas posições 1, 2 e 6; ou (b) nas posições 1, 4 e 6. Formas aquosas dessa composição possuem perfis de viscosidade aprimorados. São adicionalmente descritos métodos de uso de composições que compreendem dextrano, aumentando, por exemplo, a viscosidade de uma composição aquosa. Também são descritas reações enzimáticas de produção de dextrano.

**“COMPOSIÇÃO E MÉTODOS DE AUMENTO DA VISCOSIDADE DE  
COMPOSIÇÕES AQUOSAS, DE TRATAMENTO DE MATERIAL E DE  
PRODUÇÃO DE DEXTRANO”**

[001] O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório Norte-Americano nº 62/075.460 (depositado em cinco de novembro de 2014), que é integralmente incorporado ao presente como referência.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[002] A presente invenção encontra-se no campo de polissacarídeos. A presente invenção refere-se, por exemplo, a certos polímeros de dextrano, reações que compreendem enzimas glicosiltransferase que sintetizam esses polímeros e uso dos polímeros em diversas aplicações.

**REFERÊNCIA A LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS DEPOSITADA ELETRONICAMENTE**

[003] A cópia oficial da listagem de sequências é apresentada eletronicamente por meio de EFS-Web na forma de listagem de sequências em formato ASCII com um arquivo denominado 20151105\_CL6294USNP\_SequenceListing.txt criado em cinco de novembro de 2014 e que possui tamanho de 164 kilobytes, depositado simultaneamente com o presente relatório descritivo. A listagem de sequências contida nesse documento em formato ASCII é parte do presente relatório descritivo e é integralmente incorporado ao presente como referência.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[004] Conduzidos pelo desejo de encontrar novos polissacarídeos estruturais utilizando sínteses enzimáticas ou engenharia genética de micro-organismos, pesquisadores descobriram polissacarídeos que são biodegradáveis e podem ser elaborados economicamente com matérias-primas de fontes renováveis. Uma dessas famílias de polissacarídeos são alfa-glucanos, que são polímeros que compreendem monômeros de glicose ligados por ligações alfa-glicosídicas.

[005] Dextranos representam uma família de alfa-glucanos ramificados complexos que geralmente compreendem cadeias de monômeros de glicose ligados por alfa-1,6, com cadeias laterais periódicas (ramificações) ligadas às cadeias lineares por meio de ligação alfa-1,3 (Ioan et al, *Macromolecules* 33: 5730-5739). A produção de dextranos é tipicamente realizada por meio de fermentação de sacarose com bactérias (por exemplo, espécies de *Leuconostoc* ou *Streptococcus*), em que sacarose serve de fonte de glicose para polimerização de dextrano (Naessens et al, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 845-860; Sarwat et al, *Int. J. Biol. Sci.* 4: 379-386; Onilude et al, *Int. Food Res. J.* 20: 1645-1651). Embora dextranos sejam utilizados em diversas aplicações devido à sua alta solubilidade em água (por exemplo, adjuvantes e estabilizantes), essa alta solubilidade pode prejudicar a sua utilidade geral como agentes espessantes em aplicações de hidrocoloides.

[006] Existe, portanto, interesse pelo desenvolvimento de novos polímeros de dextrano com viscosidade mais alta que sejam menos propensos a aplicações em alta viscosidade. Por outro lado, existe também interesse na identificação de enzimas de glicosiltransferase que possam sintetizar esse polímeros de dextrano.

#### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

[007] Em uma realização, a presente invenção refere-se a uma composição que compreende dextrano e compreende:

- i. cerca de 87-93% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 6;
- ii. cerca de 0,1-1,2% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 3;
- iii. cerca de 0,1-0,7% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 4;
- iv. cerca de 7,7-8,6% em peso de glicose ligada nas posições

1, 3 e 6; e

v. cerca de 0,4-1,7% em peso de glicose ligada em:

a. posições 1, 2 e 6; ou

b. posições 1, 4 e 6;

em que o peso molecular ponderal médio (Mw) de dextrano é de cerca de 50-200 milhões de Daltons, o raio médio z de giração do dextrano é de cerca de 200-280 nm e o dextrano opcionalmente não é um produto de enzima glicosiltransferase de *Leuconostoc mesenteroides*.

[008] Em outra realização, o dextrano compreende: (i) cerca de 89,5-90,5% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 6; (ii) cerca de 0,4-0,9% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 3; (iii) cerca de 0,3-0,5% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 4; (iv) cerca de 8,0-8,3% em peso de glicose ligada nas posições 1, 3 e 6; e (v) cerca de 0,7-1,4% em peso de glicose ligada em: (a) posições 1, 2 e 6; ou (b) posições 1, 4 e 6.

[009] Em outra realização, o dextrano compreende cadeias (cadeias longas) ligadas entre si em uma estrutura de ramificação, em que as mencionadas cadeias possuem comprimento similar e compreendem substancialmente ligações alfa-1,6-glicosídicas. O comprimento médio das cadeias é de cerca de 10-50 unidades monoméricas em outra realização.

[0010] Em outra realização, o dextrano é um produto de uma enzima glicosiltransferase que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 9, SEQ ID Nº 13 ou SEQ ID Nº 17.

[0011] Em outra realização, a composição é uma composição aquosa que possui viscosidade de pelo menos cerca de 25 cPs.

[0012] Em outra realização, o Mw do dextrano é de cerca de 80-120 milhões de Daltons.

[0013] Em outra realização, o raio médio z de giração do dextrano

é de cerca de 230-250 nm.

[0014] Em outra realização, a composição encontra-se na forma de produto alimentício, produto de cuidados pessoais, produto farmacêutico, produto doméstico ou produto industrial. Em outra realização, a composição encontra-se na forma de confeito.

[0015] Em outra realização, a presente invenção refere-se a um método de aumento da viscosidade de uma composição aquosa. Este método compreende o contato de pelo menos um composto de dextrano conforme descrito no presente com uma composição aquosa. A etapa de contato neste método resulta em aumento da viscosidade da composição aquosa, em comparação com a viscosidade da composição aquosa antes da etapa de contato.

[0016] Em outra realização, a presente invenção refere-se a um método de tratamento de material. Este método compreende o contato de um material com uma composição aquosa que compreende pelo menos um composto de dextrano descrito no presente.

[0017] Em outra realização, a presente invenção refere-se a uma reação enzimática que compreende água, sacarose e uma enzima glicosiltransferase que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 13 ou SEQ ID N° 17, em que a enzima glicosiltransferase sintetiza um composto de dextrano conforme descrito no presente.

[0018] Em outra realização, a presente invenção refere-se a um método de produção de dextrano que compreende a etapa de contato de pelo menos água, sacarose e uma enzima glicosiltransferase que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 13 ou SEQ ID N° 17, de forma a produzir dextrano conforme descrito no presente. Esse dextrano pode ser

opcionalmente isolado.

[0019] Em outra realização, a viscosidade do dextrano produzido no método aumenta por meio de redução da quantidade de sacarose na etapa (a).

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E SEQUÊNCIAS**

[0020] Fig. 1: análise de HPLC do consumo de sacarose por uma reação de glicosiltransferase que compreende 100 g/l de sacarose e 0768 gtf (SEQ ID N° 1). Consulte o Exemplo 2.

[0021] Fig. 2A: mapa do plasmídeo pZZHB583 utilizado para expressar 2919 gtf (SEQ ID N° 5) em *B. subtilis*. Consulte o Exemplo 3.

[0022] Fig. 2B: mapa do plasmídeo pZZHB582 utilizado para expressar 2918 gtf (SEQ ID N° 9) em *B. subtilis*. Consulte o Exemplo 4.

[0023] Fig. 2C: mapa do plasmídeo pZZHB584 utilizado para expressar 2920 gtf (SEQ ID N° 13) em *B. subtilis*. Consulte o Exemplo 5.

[0024] Fig. 2D: mapa do plasmídeo pZZHB585 utilizado para expressar 2921 (SEQ ID N° 17) gtf em *B. subtilis*. Consulte o Exemplo 6.

[0025] Fig. 3: análise de HPLC do consumo de sacarose por meio de reação que compreende uma dextrano sucrase disponível comercialmente. Consulte o Exemplo 7.

#### **TABELA 1**

[0026] Resumo de números de SEQ ID de ácidos nucleicos e proteínas:

Descrição	Ácido nucleico SEQ ID N°	Proteína SEQ ID N°
"0768 gtf", <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> . Forma madura da identificação GENBANK n° 497964659.		1 (1447 aa)

Descrição	Ácido nucleico SEQ ID N°	Proteína SEQ ID N°
“0768 gtf”, <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> . Forma madura da identificação GENBANK n° 497964659, mas incluindo uma metionina inicial e aminoácidos N e C-terminais adicionais		2 (1457 aa)
WciGtf1, <i>Weissella cibaria</i> . Forma de comprimento total que compreende sequência de sinal. Acesso GENBANK n° ZP_08417432 (sequência de aminoácidos).	3 (4347 bases)	4 (1448 aa)
“2919 gtf”, <i>Weissella cibaria</i> . Forma madura da identificação GENBANK n° ZP_08417432.		5 (1422 aa)
“2919 gtf”, <i>Weissella cibaria</i> . Sequência otimizada para expressão em <i>B. subtilis</i> . Codifica 2919 gtf com uma sequência de sinais heteróloga e aminoácidos N-terminais adicionais	6 (4269 bases)	
LfeGtf1, <i>Lactobacillus fermentum</i> . Forma de comprimento total que compreende sequência de sinal. Acesso GENBANK n° AAU08008 (sequência de aminoácidos).	7 (4392 bases)	8 (1463 aa)
“2918 gtf”, <i>Lactobacillus fermentum</i> . Forma madura da identificação GENBANK n° AAU08008.		9 (1426 aa)
“2918 gtf”, <i>Lactobacillus fermentum</i> . Sequência otimizada para expressão em <i>B. subtilis</i> . Codifica 2918 gtf com uma sequência de sinais heteróloga	10 (4281 bases)	

Descrição	Ácido nucleico SEQ ID N°	Proteína SEQ ID N°
e aminoácidos N-terminais adicionais.		
SsoGtf4, <i>Streptococcus sobrinus</i> . Forma de comprimento total que compreende sequência de sinal. Acesso GENBANK n° AAX76986 (sequência de aminoácidos).	11 (4521 bases)	12 (1506 aa)
“2920 gtf”, <i>Streptococcus sobrinus</i> . Forma madura da identificação GENBANK n° AAX76986.		13 (1465 aa)
“2920 gtf”, <i>Streptococcus sobrinus</i> . Sequência otimizada para expressão em <i>B. subtilis</i> . Codifica 2920 gtf com uma sequência de sinais heteróloga e aminoácidos N-terminais adicionais	14 (4398 bases)	
SdoGtf7, <i>Streptococcus downei</i> . Forma de comprimento total que compreende sequência de sinal. Acesso GENBANK n° ZP_08549987.1 (sequência de aminoácidos).	15 (4360 bases)	16 (1453 aa)
“2921 gtf”, <i>Streptococcus downei</i> . Forma madura da identificação GENBANK n° ZP_08549987.1.		17 (1409 aa)
“2921 gtf”, <i>Streptococcus downei</i> . Sequência otimizada para expressão em <i>B. subtilis</i> . Codifica 2921 gtf com uma sequência de sinais heteróloga e aminoácidos N-terminais adicionais.	18 (4230 bases)	

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[0027] As revelações de toda a literatura de patente e não de patente mencionada são integralmente incorporadas ao presente como referência.



[0028] A menos que indicado em contrário, os termos “um” e “uma”, da forma utilizada no presente, englobam uma ou mais (ou seja, pelo menos uma) característica indicada.

[0029] O termo “glucano” no presente indica um polissacarídeo de monômeros de D-glicose que são ligados por ligações glicosídicas, que são um tipo de ligação glicosídica. “Alfa-glucano” no presente indica glucano no qual os monômeros de D-glicose componentes são monômeros de alfa-D-glicose.

[0030] Os termos “dextrano”, “polímero de dextrano”, “composto de dextrano” e similares são utilizados de forma intercambiável no presente e designam alfa-glucanos ramificados complexos que compreendem geralmente cadeias de monômeros de glicose substancialmente (principalmente) ligados por alfa-1,6, com cadeias laterais (ramificações) ligadas principalmente por ligação alfa-1,3. A expressão “dextrano gelificante” no presente designa a capacidade de um ou mais dextranos descritos no presente de formar uma solução viscosa ou composição similar a gel (i) durante a síntese de dextrano enzimática e, opcionalmente, (ii) quando esse dextrano sintetizado for isolado (por exemplo >90% puro) e colocado em seguida em uma composição aquosa.

[0031] “Cadeias longas” de dextrano no presente podem compreender “ligações substancialmente (ou principalmente) alfa-1,6-glicosídicas”, o que significa que elas podem possuir pelo menos cerca de 98,0% de ligações alfa-1,6-glicosídicas em alguns aspectos. Dextrano no presente pode compreender uma “estrutura de ramificação” (estrutura ramificada) em alguns aspectos. Contempla-se que, nessa estrutura, cadeias longas ramificam-se a partir de outras cadeias longas, provavelmente de forma iterativa (uma cadeia longa pode ser, por exemplo, uma ramificação de outra cadeia longa, que, por sua vez, pode ser uma ramificação de outra cadeia longa e assim por diante). Contempla-se que cadeias longas nessa estrutura podem ter “comprimento similar”, o que significa que o comprimento (DP (grau de polimerização)) de pelo

menos 70% de todas as cadeias longas em uma estrutura de ramificação encontra-se dentro de mais/menos 30% do comprimento médio de todas as cadeias longas da estrutura de ramificação.

[0032] Dextrano, em algumas realizações, pode também compreender “cadeias curtas” que se ramificam a partir das cadeias longas, tipicamente com um a três monômeros de glicose de comprimento, e compreendem menos de cerca de 10% de todos os monômeros de glicose de um polímero de dextrano. Essas cadeias curtas compreendem tipicamente ligações alfa-1,2, alfa-1,3 e/ou alfa-1,4-glicosídicas (acredita-se que possa também haver pequeno percentual dessas ligações não de alfa-1,6 em cadeias longas em alguns aspectos).

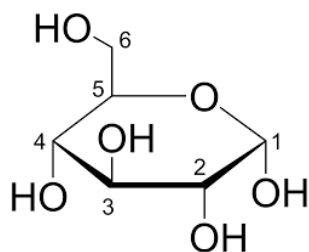
[0033] As expressões “ligação glicosídica” e “união glicosídica” são utilizadas de forma intercambiável no presente e designam a ligação covalente que liga uma molécula de carboidrato a outra molécula de carboidrato. As expressões “ligação glicosídica” e “união glicosídica” são utilizadas de forma intercambiável no presente e designam uma ligação glicosídica entre duas moléculas de glicose. A expressão “ligação alfa-1,6-glicosídica”, da forma utilizada no presente, designa a ligação covalente que liga moléculas de alfa-D-glicose entre si por meio dos carbonos 1 e 6 sobre anéis de alfa-D-glicose adjacentes. A expressão “ligação alfa-1,3-glicosídica”, da forma utilizada no presente, designa a ligação covalente que liga moléculas de alfa-D-glicose entre si por meio dos carbonos 1 e 3 sobre anéis de alfa-D-glicose adjacentes. A expressão “ligação alfa-1,2-glicosídica”, da forma utilizada no presente, designa a ligação covalente que liga moléculas de alfa-D-glicose entre si por meio dos carbonos 1 e 2 sobre anéis de alfa-D-glicose adjacentes. A expressão “ligação alfa-1,4-glicosídica”, da forma utilizada no presente, designa a ligação covalente que liga moléculas de alfa-D-glicose entre si por meio dos carbonos 1 e 4 sobre anéis de alfa-D-glicose adjacentes. No presente, “alfa-D-glicose” será indicada

como “glicose”. Todas as ligações glicosídicas descritas no presente são ligações alfa-glicosídicas, exceto quando indicado em contrário.

[0034] “Glicose (monômeros de glicose) ligada nas posições 1 e 6” indica no presente um monômero de glicose de dextrano, em que somente os carbonos 1 e 6 do monômero de glicose são envolvidos em ligações glicosídicas correspondentes com dois monômeros de glicose adjacentes. Essa definição aplica-se, de forma similar, a glicose (i) “ligada nas posições 1 e 3” e (ii) “ligada nas posições 1 e 4”, considerando, portanto, as diferentes posições de carbono envolvidas em cada ligação correspondente.

[0035] “Glicose (monômeros de glicose) ligada nas posições 1, 3 e 6” indica no presente um monômero de glicose de dextrano, em que os carbonos 1, 3 e 6 do monômero de glicose são envolvidos em ligações glicosídicas correspondentes com três monômeros de glicose adjacentes. Glicose ligada apenas nas posições 1, 3 e 6 é um ponto de ramificação. Essa definição aplica-se, de forma similar, a glicose ligada (i) nas posições 1, 2 e 6 e (iii) nas posições 1, 4 e 6, mas considerando, portanto, as diferentes posições de carbono envolvidas em cada ligação correspondente.

[0036] As posições de glicose (posições de carbono em glicose) 1, 2, 3, 4 e 6 do presente são de acordo com o estado da técnica (ilustradas na estrutura a seguir):



[0037] O perfil de ligação glicosídica de dextrano no presente pode ser determinado utilizando qualquer método conhecido na técnica. Pode-se determinar, por exemplo, um perfil de ligação utilizando métodos que utilizam espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) (por exemplo, NMR

$^{13}\text{C}$  ou NMR  $^1\text{H}$ ). Esses e outros métodos que podem ser utilizados são descritos em *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications* (S. W. Cui, Ed., Capítulo 3, S. W. Cui, *Structural Analysis of Polysaccharides*, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton, FL, 2005), que é incorporado ao presente como referência.

[0038] O termo “sacarose” no presente designa um dissacarídeo não redutor composto de uma molécula de alfa-D-glicose e uma molécula de beta-D-frutose ligada por uma ligação alfa-1,2-glicosídica. Sacarose é comumente conhecida como açúcar de cozinha.

[0039] O “peso molecular” de dextrano no presente pode ser representado na forma de peso molecular numérico médio ( $M_n$ ) ou peso molecular ponderal médio ( $M_w$ ), cujas unidades são em Daltons ou gramas/mol. Alternativamente, peso molecular pode ser representado em DPw (grau de polimerização ponderal médio) ou DPn (grau de polimerização numérico médio). Vários meios são conhecidos na técnica para calcular essas medições de peso molecular, tais como cromatografia de líquidos sob alta pressão (HPLC), cromatografia de exclusão de tamanhos (SEC) ou cromatografia de permeação de gel (GPC).

[0040] A expressão “raio de giração” ( $R_g$ ) no presente designa o raio médio de dextrano e é calculado como a raiz quadrada média da distância entre e componentes de uma molécula de dextrano (átomos) e o centro de gravidade da molécula.  $R_g$  pode ser fornecido, por exemplo, em unidades Angstrom ou nanômetro (nm). O “raio de giração médio z” de dextrano no presente designa o  $R_g$  de dextrano conforme medido utilizando difusão de luz (por exemplo, MALS). Métodos de medição de  $R_g$  médio z são conhecidos e podem, portanto, ser utilizados no presente.  $R_g$  médio z pode ser medido, por exemplo, conforme descrito na Patente Norte-Americana nº 7.531.073, Pedidos de Patente Norte-Americanos publicados nº 2010/0003515 e 2009/0046274,

Wyatt (*Anal. Chim. Acta* 272: 1-40) e Mori e Barth (*Size Exclusion Chromatography*, Springer-Verlag, Berlim, 1999), todos os quais são incorporados ao presente como referência.

[0041] As expressões “enzima glicosiltransferase”, “enzima gtf”, “catalisador de enzima gtf”, “gtf”, “glucano sucrase” e similares são utilizadas de forma intercambiável no presente. A atividade de enzima gtf no presente catalisa a reação do substrato de sacarose para elaborar os produtos glucano e frutose. Uma enzima gtf que produz dextrano (um tipo de glucano) pode também ser denominada dextranossucrased. Outros produtos (subprodutos) de uma reação gtf podem incluir glicose (em que a glicose é hidrolisada a partir do complexo intermediário de enzima glicosil-gtf) e vários oligossacarídeos solúveis (por exemplo, DP2-DP7), tais como leucrose. Formas do tipo selvagem de enzimas glicosiltransferase geralmente contêm (na direção N-terminal para C-terminal) um peptídeo de sinal, domínio variável, domínio catalítico e domínio de ligação de glucano. No presente, gtf é classificada na família de glicosídeo hidrolase 70 (GH70) de acordo com o banco de dados CAZy (Enzimas Ativas de Carboidrato) (Cantarel et al, *Nucleic Acids Res.* 37: D233-238, 2009).

[0042] As expressões “domínio catalítico de glicosiltransferase” e “domínio catalítico” são utilizadas de forma intercambiável no presente e designam o domínio de uma enzima glicosiltransferase que proporciona atividade produtora de glucano à enzima glicosiltransferase.

[0043] As expressões “reação de gtf”, “solução de reação de gtf”, “reação de glicosiltransferase”, “reação enzimática”, “reação de síntese de dextrano”, “reação de dextrano” e similares são utilizadas de forma intercambiável no presente e designam uma reação que é realizada por uma enzima glicosiltransferase. Reação de gtf, da forma utilizada no presente, geralmente designa uma reação que compreende inicialmente pelo menos uma enzima glicosiltransferase ativa em uma solução que compreende sacarose,

água e, opcionalmente, outros componentes. Outros componentes que podem encontrar-se em uma reação de gtf após o seu início incluem frutose, glicose, oligossacarídeos solúveis (por exemplo, DP2-DP7) tais como leucrose e produtos de dextrano. É na reação de gtf que é realizada a etapa de contato de água, sacarose e uma enzima glicosiltransferase. A expressão “sob condições de reação de gtf apropriadas”, da forma utilizada no presente, designa condições de reação de gtf que sustentam a conversão de sacarose em dextrano por meio da atividade de enzima glicosiltransferase. A reação de gtf no presente não ocorre naturalmente.

[0044] Reação de gtf “controle”, da forma utilizada no presente, pode designar uma reação que utiliza uma glicosiltransferase que não compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 9, SEQ ID Nº 13 ou SEQ ID Nº 17. Todas as outras características (por exemplo, concentração de sacarose, temperatura, pH, tempo) de uma solução de reação de controle podem ser as mesmas da reação com a qual ela está sendo comparada).

[0045] O “percentual de sólidos secos” de reação de gtf designa o percentual em peso de todos os açúcares em uma reação de gtf. O percentual de sólidos secos de uma reação de gtf pode ser calculado, por exemplo, com base na quantidade de sacarose utilizada para preparar a reação.

[0046] O “rendimento” de dextrano por uma reação de gtf no presente representa o peso de produto de dextrano expresso na forma de percentual do peso de substrato de sacarose que é convertido na reação. Se 100 g de sacarose em uma solução de reação forem convertidos em produtos e 10 g dos produtos forem dextrano, por exemplo, o rendimento do dextrano será de 10%. Este cálculo de rendimento pode ser considerado medida da seletividade da reação para dextrano.

[0047] As expressões “percentual em volume” “volume percentual”,

“% vol”, “% v/v” e similares são utilizadas de forma intercambiável no presente. O percentual em volume de um soluto em uma solução pode ser determinado utilizando a fórmula:  $[(\text{volume de soluto})/(\text{volume de solução})] \times 100\%$ .

[0048] As expressões “percentual em peso”, “percentual em peso (% peso)”, “percentual em peso-peso (% p/p)” e similares são utilizadas de forma intercambiável no presente. Percentual em peso designa o percentual de um material com base em massa conforme compreendido em uma composição, mistura ou solução.

[0049] O termo “aumentado”, da forma utilizada no presente, pode designar quantidade ou atividade que é pelo menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% maior que a quantidade ou atividade com a qual a quantidade ou atividade maior está sendo comparada. Os termos “aumentado”, “elevado”, “aprimorado”, “maior que”, “aprimorado” e similares são utilizados de forma intercambiável no presente.

[0050] As expressões “polinucleotídeo”, “sequência de polinucleotídeos” e “sequência de ácidos nucleicos” são utilizadas de forma intercambiável no presente. Essas expressões englobam sequências de nucleotídeos e similares. Um polinucleotídeo pode ser um polímero de RNA ou DNA que possui fita simples ou dupla, que contém opcionalmente bases de nucleotídeos sintéticas, não naturais ou alteradas. Um polinucleotídeo pode ser compreendido por um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico, DNA sintético ou suas misturas.

[0051] O termo “gene”, da forma utilizada no presente, designa uma sequência de polinucleotídeos de DNA que expressa RNA (RNA é transcrito a partir da sequência de polinucleotídeos de DNA) de uma região de codificação (sequência de codificação), em que esse RNA pode ser um RNA mensageiro (que codifica uma proteína) ou RNA que não codifica proteína. Gene pode

designar a região de codificação isolada ou pode incluir sequências reguladoras acima e/ou abaixo no fluxo da região de codificação (por exemplo, promotores, regiões não traduzidas 5', regiões terminais de transcrição 3'). Uma região de codificação que codifica uma proteína pode ser alternativamente denominada no presente "quadro de leitura aberto" (ORF). Um gene que é "nativo" ou "endógeno" indica um gene encontrado na natureza com suas próprias sequências reguladoras; esse gene está posicionado no seu local natural no genoma de uma célula hospedeira. Gene "quimérico" designa qualquer gene que não seja um gene nativo, que compreende sequências reguladoras e de codificação que não são encontradas juntas na natureza (ou seja, as regiões reguladoras e de codificação são heterólogas entre si). Consequentemente, um gene quimérico pode compreender sequências reguladoras e sequências de codificação que são derivadas de fontes diferentes ou sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de forma diferente da encontrada na natureza. Gene "exógeno" ou "heterólogo" indica um gene que é introduzido em um organismo hospedeiro por meio de transferência genética. Genes exógenos podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não nativo, genes nativos introduzidos em um novo local no hospedeiro nativo ou genes quiméricos. Sequências de polinucleotídeos, em certas realizações descritas no presente, são heterólogas. "Transgene" é um gene que foi introduzido no genoma por meio de um procedimento de transformação. Quadro de Leitura aberto "otimizado por códons" possui a sua frequência de uso de códons projetada para imitar a frequência de uso de códons preferida da célula hospedeira.

[0052] O termo "recombinante" ou "heterólogo", da forma utilizada no presente, designa uma combinação artificial de dois segmentos de sequências separados de outra forma, tal como por meio de síntese química ou da manipulação de segmentos isolados de ácidos nucleicos por meio de



métodos de engenharia genética. Os termos “recombinante”, “transgênico”, “transformado”, “elaborado” ou “modificado para expressão genética exógena” são utilizados de forma intercambiável no presente.

[0053] Uma sequência de polinucleotídeos ou aminoácidos nativa é de ocorrência natural, enquanto uma sequência de polinucleotídeos ou sequência de aminoácidos não nativa não ocorre na natureza.

[0054] “Sequências reguladoras”, da forma utilizada no presente, designa sequências de nucleotídeos localizadas acima no fluxo de um local de início de transcrição genética (por exemplo, promotor), regiões não traduzidas 5’ e regiões não codificadoras 3’, que podem influenciar a transcrição, processamento, estabilidade ou tradução de RNA transcrito a partir do gene. Sequências reguladoras no presente podem incluir promotores, amplificadores, silenciadores, sequências líderes não traduzidas 5’, introns, sequências de reconhecimento de poliadenilação, locais de processamento de RNA, locais de ligação de efetores, estruturas de circuito e haste e outros elementos envolvidos na regulação da expressão genética. Um ou mais elementos reguladores no presente podem ser heterólogos para uma região de codificação no presente.

[0055] Métodos de preparação de vetores/construções recombinantes no presente podem seguir métodos de clonagem molecular e DNA recombinante padrão conforme descrito por J. Sambrook e D. Russell (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, terceira edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001); T. J. Silhavy et al (*Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1984); e F. M. Ausubel et al (*Short Protocols in Molecular Biology*, quinta edição, *Current Protocols*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, 2002).

[0056] As expressões “identidade de sequências” ou “identidade”, da forma utilizada no presente com relação a sequências de polipeptídeos ou polinucleotídeos, designam os resíduos de aminoácidos ou bases de ácidos

nucleicos em duas sequências que são idênticas quando alinhadas para correspondência máxima ao longo de uma janela de comparação especificada. Desta forma, “percentual de identidade de sequências” ou “percentual de identidade” indica o valor determinado por meio da comparação de duas sequências alinhadas idealmente ao longo de uma janela de comparação, em que a parte da sequência de polinucleotídeos ou polipeptídeos na janela de comparação pode compreender adições ou exclusões (ou seja, intervalos) em comparação com a sequência de referência (que não compreende adições nem exclusões) para alinhamento ideal das duas sequências. O percentual é calculado por meio de determinação da quantidade de posições em que o resíduo de aminoácidos ou base de ácido nucleico idêntico ocorre nas duas sequências para gerar o número de posições coincidentes, dividindo o número de posições coincidentes pelo número total de posições na janela de comparação e multiplicando os resultados por cem para gerar o percentual de identidade de sequências. Compreender-se-á que, ao calcular-se identidade de sequências entre uma sequência de DNA e uma sequência de RNA, resíduos T da sequência de DNA alinham-se e podem ser considerados “idênticos” a resíduos U da sequência de RNA. Para fins de determinação do percentual de complementaridade de primeiro e segundo nucleotídeos, pode-se obtê-lo determinando-se (i) o percentual de identidade entre o primeiro polinucleotídeo e a sequência de complemento do segundo polinucleotídeo (ou vice-versa), por exemplo, e/ou (ii) o percentual de bases entre os primeiro e segundo polinucleotídeos que criariam pares de bases Watson e Crick canônicos.

[0057] O algoritmo Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (BLAST), que é disponível online no website do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI), pode ser utilizado, por exemplo, para medir o percentual de identidade entre duas ou mais das sequências de polinucleotídeos (algoritmo BLASTN) ou sequências de polipeptídeos (algoritmo

BLASTP) descritas no presente. Alternativamente, o percentual de identidade entre sequências pode ser realizado utilizando um algoritmo Clustal (por exemplo, ClustalW, ClustalV ou Clustal Ômega). Para diversos alinhamentos utilizando o método de alinhamento Clustal, os valores padrão podem corresponder a PENALIDADE DO INTERVALO = 10 e PENALIDADE DO COMPRIMENTO DO INTERVALO = 10. Os parâmetros padrão para alinhamentos em pares e cálculo do percentual de identidade de sequências de proteínas utilizando método Clustal podem ser COMPRIMENTO DE PALAVRA = 1, PENALIDADE DO INTERVALO = 3, VISUALIZAÇÃO DO MELHOR RESULTADO = 5 e ESPAÇAMENTO EM DIAGONAIS = 5. Para ácidos nucleicos, esses parâmetros podem ser COMPRIMENTO DE PALAVRA = 2, PENALIDADE DO INTERVALO = 5, VISUALIZAÇÃO DO MELHOR RESULTADO = 4 e ESPAÇAMENTO EM DIAGONAIS = 4. Ainda alternativamente, o percentual de identidade entre sequências pode ser realizado utilizando um algoritmo EMBOSS (por exemplo, agulha), com parâmetros tais como ABERTURA DE INTERVALO = 10, EXTENSÃO DE INTERVALO = 0,5, PENALIDADE DE FINAL DE INTERVALO = falso, ABERTURA DE FINAL DE INTERVALO = 10, EXTENSÃO DE FINAL DE INTERVALO = 0,5 utilizando uma matriz BLOSUM (por exemplo, BLOSUM62).

[0058] Várias sequências de aminoácidos de polipeptídeos e sequências de polinucleotídeos são descritas no presente como características de certas realizações. Podem ser utilizadas variantes dessas sequências que são pelo menos cerca de 70-85%, 85-90% ou 90-95% idênticas às sequências descritas no presente. Alternativamente, sequências de polinucleotídeos ou sequências de aminoácidos variantes podem ter pelo menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com uma sequência descrita no presente. A sequência de

polinucleotídeos ou sequência de aminoácidos variante podem possuir a mesma função/atividade da sequência descrita ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da função/atividade da sequência descrita. Qualquer sequência de aminoácidos de polipeptídeos descrita no presente que não se inicia com metionina pode tipicamente compreender ainda pelo menos uma metionina inicial no terminal N da sequência de aminoácidos. Qualquer sequência de aminoácidos de polipeptídeos descrita no presente que se inicie com metionina pode ser opcionalmente considerada sem esse resíduo de metionina (ou seja, uma sequência de polipeptídeos pode ser indicada com referência ao resíduo de posição 2 para o resíduo C-terminal da sequência).

[0059] O termo “isolado”, da forma utilizada, designa qualquer componente celular que tenha sido completa ou parcialmente purificado da sua fonte nativa (por exemplo, molécula de polipeptídeo ou polinucleotídeo isolada). Em alguns casos, uma molécula de polipeptídeo ou polinucleotídeo isolada é parte de uma composição maior, sistema tampão ou mistura de reagentes. Uma molécula de polipeptídeo ou polinucleotídeo isolada pode ser compreendida, por exemplo, em uma célula ou organismo de forma heteróloga. Outro exemplo é uma reação ou enzima glicosiltransferase isolada. “Isolado” no presente pode também caracterizar um composto de dextrano. Desta forma, os compostos de dextrano de acordo com a presente invenção são compostos sintéticos, preparados pelo homem e/ou exibem propriedades que não se acredita que ocorram naturalmente.

[0060] “Composição aquosa” no presente possui um componente líquido que compreende, por exemplo, pelo menos cerca de 10% em peso de água. Exemplos de composições aquosas incluem, por exemplo, misturas, soluções, dispersões (por exemplo, dispersões coloidais), suspensões e emulsões. As composições aquosas, em certas realizações, compreendem

dextrano que é dissolvido na composição aquosa (ou seja, em solução e tipicamente possui viscosidade).

[0061] Da forma utilizada no presente, a expressão “dispersão coloidal” designa um sistema heterogêneo que possui fase dispersa e meio de dispersão, ou seja, partículas insolúveis microscopicamente dispersas são suspensas em outra substância (por exemplo, uma composição aquosa tal como água ou solução aquosa). Um exemplo de dispersão coloidal no presente é um hidrocoloide. As partículas de uma dispersão coloidal, tais como hidrocoloide, podem, no todo ou em parte, compreender certos compostos de dextrano de acordo com a presente invenção. As expressões “dispersante” e “agente de dispersão” são utilizadas de forma intercambiável no presente para designar um material que promova a formação e/ou estabilização de uma dispersão.

[0062] Os termos “hidrocoloide” e “hidrogel” são utilizados de forma intercambiável no presente. Hidrocoloide designa um sistema coloidal no qual água é o meio de dispersão.

[0063] A expressão “solução aquosa” no presente designa uma solução na qual o solvente compreende água. Uma solução aquosa pode servir de dispersante em certos aspectos no presente. Compostos de dextrano em certas realizações podem ser dissolvidos, dispersos ou misturados em uma solução aquosa.

[0064] As expressões “dispersante”, “agente de dispersão” e similares são utilizadas de forma intercambiável no presente para designar um material que promova a formação e a estabilização de uma dispersão de uma substância em outra. “Dispersão” no presente designa uma composição aquosa que compreende uma ou mais partículas (por exemplo, qualquer ingrediente de um produto de cuidados pessoais, produto farmacêutico, produto alimentício, produto doméstico ou produto industrial descrito no presente) e que é espalhado ou uniformemente espalhado ao longo de toda a composição aquosa.

[0065] O termo “viscosidade”, da forma utilizada no presente, designa a medida da extensão à qual um fluido ou composição aquosa, tal como hidrocoloide, resiste a uma força que tende a causar o seu fluxo. Várias unidades de viscosidade que podem ser utilizadas no presente incluem centipoise (cPs) e Pascal-segundo (Pa·s). Centipoise é um centésimo de poise; um poise é igual a  $0,100 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Desta forma, as expressões “modificador da viscosidade”, “agente de modificação da viscosidade” e similares, da forma utilizada no presente, designam qualquer coisa que possa alterar/modificar a viscosidade de um fluido ou composição aquosa.

[0066] A expressão “comportamento de afinamento de corte”, da forma utilizada no presente, designa redução da viscosidade de uma composição aquosa à medida que aumenta a velocidade de corte. A expressão “comportamento de espessamento de corte”, da forma utilizada no presente, designa aumento da viscosidade de uma composição aquosa à medida que aumenta a velocidade de corte. “Velocidade de corte” no presente indica a velocidade à qual se aplica deformação de corte progressiva a uma composição aquosa. Pode-se aplicar deformação de corte de forma giratória.

[0067] O termo “contato”, da forma utilizada no presente com relação a métodos de aumento da viscosidade de uma composição aquosa, designa qualquer ação que resulte na reunião de uma composição aquosa com dextrano. Pode-se realizar contato por qualquer meio conhecido na técnica, tal como, por exemplo, dissolução, mistura, agitação ou homogeneização.

[0068] Os termos “confeitaria”, “confeito”, “doce”, “polpa doce” e similares são utilizados de forma intercambiável no presente. Confeito designa qualquer produto alimentício aromatizado que possui sabor doce, cuja consistência pode ser dura ou mole e que é tipicamente consumido por meio de sucção e/ou mastigação no interior da cavidade oral. O confeito pode conter açúcar ou ser livre de açúcar.

[0069] Os termos “tecido”, “têxtil”, “pano” e similares são utilizados de forma intercambiável no presente para designar um material tecido que possui uma rede de fibras naturais e/ou artificiais. Essas fibras podem ser, por exemplo, cordões ou fios.

[0070] “Composição de cuidado com tecidos”, no presente, é qualquer composição apropriada para o tratamento de tecidos de alguma forma. Exemplos dessa composição incluem detergentes de lavanderia e amaciantes de tecidos.

[0071] As expressões “detergente de limpeza pesada”, “detergente para todos os fins” e similares são utilizadas de forma intercambiável no presente para designar um detergente útil para lavagem regular de tecidos brancos e coloridos sob qualquer temperatura. As expressões “detergente de limpeza delicada” ou “detergente de tecidos finos” são utilizadas de forma intercambiável no presente para designar um detergente útil para cuidar de tecidos delicados, tais como viscose, lã, seda, microfibras ou outros tecidos que necessitam de cuidados especiais. “Cuidados especiais” podem incluir, por exemplo, condições de uso de água em excesso, baixa agitação e/ou sem alvejante.

[0072] “Composição detergente” compreende tipicamente no presente pelo menos um tensoativo (composto detergente) e/ou pelo menos um construtor. “Tensoativo” designa no presente uma substância que tende a reduzir a tensão superficial de um líquido no qual é dissolvida a substância. Tensoativo pode agir, por exemplo, como detergente, agente umectante, emulsificante, agente formador de espuma e/ou dispersante.

[0073] As expressões “agente antirredeposição”, “agente antirredeposição de sujeira”, “agente antienvelhecimento” e similares designam no presente agentes que ajudam a evitar o redépósito de sujeira sobre a roupa em água de lavagem de lavanderia após a remoção dessa sujeira, de forma a evitar o envelhecimento/descoloração da lavagem. Agentes antirredeposição

podem funcionar ajudando a manter o solo disperso em água de lavagem e/ou bloqueando a fixação de sujeira a superfícies de tecido.

[0074] “Composição de cuidados orais” no presente é qualquer composição apropriada para o tratamento de superfície mole ou dura na cavidade oral, tal como superfícies dentais (dentes) e/ou da gengiva.

[0075] O termo “adsorção” designa no presente a adesão de um composto (por exemplo, dextrano no presente) à superfície de um material.

[0076] As expressões “celulase”, “enzima celulase” e similares são utilizadas de forma intercambiável no presente para designar uma enzima que hidrolisa ligações beta-1,4-D glicosídicas em celulose, de forma a degradar celulose completa ou parcialmente. Celulase pode ser alternativamente denominada “beta-1,4-glucanase”, por exemplo, e pode ter atividade de endocelulase (EC 3.2.1.4), atividade de exocelulase (EC 3.2.1.91) ou atividade de celobiase (EC 3.2.1.21). “Celulose” designa um polissacarídeo insolúvel que possui cadeia linear de unidades monoméricas de D-glicose ligados por beta-1,4.

[0077] Existe interesse pelo desenvolvimento de novos polímeros de dextrano com alta viscosidade que sejam mais propensos a aplicações de gelificação. Por outro lado, existe também interesse na identificação de enzimas de glicosiltransferase que possam sintetizar esse polímeros de dextrano.

[0078] Realizações da presente invenção referem-se a uma composição que compreende dextrano, que compreende:

- i. cerca de 87-93% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 6;
- ii. cerca de 0,1-1,2% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 3;
- iii. cerca de 0,1-0,7% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 4;



iv. cerca de 7,7-8,6% em peso de glicose ligada nas posições 1, 3 e 6; e

v. cerca de 0,4-1,7% em peso de glicose ligada em: (a) posições 1, 2 e 6; ou (b) posições 1, 4 e 6.

[0079] O peso molecular ponderal médio (Mw) e o raio médio z de giração desse dextrano é de cerca de 50-200 milhões de Daltons e cerca de 200-280 nm, respectivamente. Além disso, esse dextrano opcionalmente não é um produto de uma enzima glicosiltransferase de *Leuconostoc mesenteroides*.

[0080] Um exemplo dessa composição é uma reação de glicosiltransferase na qual é sintetizado um dextrano com o perfil de tamanho, peso e ligação acima. Significativamente, esse dextrano exibiu alta viscosidade em composições aquosas, mesmo sob concentrações relativamente baixas do dextrano. Acredita-se que esse perfil de alta viscosidade seja exclusivo em comparação com os perfis de viscosidade de polímeros de dextrano descritos anteriormente.

[0081] Dextrano pode compreender no presente (i) cerca de 87-93% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 6; (ii) cerca de 0,1-1,2% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 3; (iii) cerca de 0,1-0,7% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 4; (iv) cerca de 7,7-8,6% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1, 3 e 6; e (v) cerca de 0,4-1,7% em peso de glicose ligada apenas em: (a) posições 1, 2 e 6; ou (b) posições 1, 4 e 6. Em certas realizações, dextrano pode compreender (i) cerca de 89,5-90,5% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 6; (ii) cerca de 0,4-0,9% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 3; (iii) cerca de 0,3-0,5% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 4; (iv) cerca de 8,0-8,3% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1, 3 e 6; e (v) cerca de 0,7-1,4% em peso de glicose ligada apenas em: (a) posições 1, 2 e 6; ou (b) posições 1, 4 e 6.

[0082] Dextrano, em alguns aspectos da presente invenção, pode compreender cerca de 87, 87,5, 88, 88,5, 89, 89,5, 90, 90,5, 91, 91,5, 92, 92,5 ou 93% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 6. Pode haver cerca de 87-92,5, 87-92, 87-91,5, 87-91, 87-90,5, 87-90, 87,5-92,5, 87,5-92, 87,5-91,5, 87,5-91, 87,5-90,5, 87,5-90, 88-92,5, 88-92, 88-91,5, 88-91, 88-90,5, 88-90, 88,5-92,5, 88,5-92, 88,5-91,5, 88,5-91, 88,5-90,5, 88,5-90, 89-92,5, 89-92, 89-91,5, 89-91, 89-90,5, 89-90, 89,5-92,5, 89,5-92, 89,5-91,5, 89,5-91 ou 89,5-90,5% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 6, em alguns casos.

[0083] Dextrano, em alguns aspectos, pode compreender cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 ou 1,2% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 3. Pode haver cerca de 0,1-1,2, 0,1-1,0, 0,1-0,8, 0,3-1,2, 0,3-1,0, 0,3-0,8, 0,4-1,2, 0,4-1,0, 0,4-0,8, 0,5-1,2, 0,5-1,0, 0,5-0,8, 0,6-1,2, 0,6-1,0 ou 0,6-0,8% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 3, em alguns casos.

[0084] Dextrano, em alguns aspectos, pode compreender cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 ou 0,7% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 4. Pode haver cerca de 0,1-0,7, 0,1-0,6, 0,1-0,5, 0,1-0,4, 0,2-0,7, 0,2-0,6, 0,2-0,5, 0,2-0,4, 0,3-0,7, 0,3-0,6, 0,3-0,5 ou 0,3-0,4% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 4, em alguns casos.

[0085] Dextrano, em alguns aspectos, pode compreender cerca de 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, ou 8,6% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1, 3 e 6. Pode haver cerca de 7,7-8,6, 7,7-8,5, 7,7-8,4, 7,7-8,3, 7,7-8,2, 7,8-8,6, 7,8-8,5, 7,8-8,4, 7,8-8,3, 7,8-8,2, 7,9-8,6, 7,9-8,5, 7,9-8,4, 7,9-8,3, 7,9-8,2, 8,0-8,6, 8,0-8,5, 8,0-8,4, 8,0-8,3, 8,0-8,2, 8,1-8,6, 8,1-8,5, 8,1-8,1, 8,1-8,3 ou 8,1-8,2% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1, 3 e 6, em alguns casos.

[0086] Dextrano, em alguns aspectos, pode compreender cerca de 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6 ou 1,7% em peso de

glicose ligada apenas (a) nas posições 1, 2 e 6 ou (b) nas posições 1, 4 e 6. Pode haver cerca de 0,4-1,7, 0,4-1,6, 0,4-1,5, 0,4-1,4, 0,4-1,3, 0,5-1,7, 0,5-1,6, 0,5-1,5, 0,5-1,4, 0,5-1,3, 0,6-1,7, 0,6-1,6, 0,6-1,5, 0,6-1,4, 0,6-1,3, 0,7-1,7, 0,7-1,6, 0,7-1,5, 0,7-1,4, 0,7-1,3, 0,8-1,7, 0,8-1,6, 0,8-1,5, 0,8-1,4 ou 0,8-1,3% em peso de glicose ligada apenas (a) nas posições 1, 2 e 6 ou (b) nas posições 1, 4 e 6, em alguns casos.

[0087] O perfil de ligação glicosídica de dextrano pode ser determinado utilizando dextrano produzido seguindo qualquer protocolo descrito no presente. Um exemplo de protocolo de determinação de ligações apropriado pode ser similar ou idêntico ao protocolo descrito no Exemplo 9. Uma reação de enzima gtf 0768 que foi desativada por meio de aquecimento da reação a cerca de 70-90 °C (por exemplo, 80 °C) por cerca de 5-30 minutos (por exemplo, dez minutos), por exemplo, é colocada em tubulação de diálise (elaborada, por exemplo, com celulose regenerada) com MWCO de 12-14 kDa (por exemplo, tubulação de diálise Spectra/Por® 4, Parte nº 132706, Spectrum Laboratories, Inc.). A reação desativada é dialisada em seguida contra um grande volume de água (por exemplo, 3-5 l) a cerca de 20-25 °C (temperatura ambiente) ao longo de cerca de 4-10 dias (por exemplo, sete dias); essa água pode ser substituída todos os dias durante a diálise. O produto de dextrano é, em seguida, (i) precipitado por meio de mistura da reação desativada dialisada com volume de reação de cerca de 1-2x (1,5x) de 100% metanol; (ii) lavado pelo menos duas vezes com o mesmo volume de 100% de metanol; e (iii) seco a cerca de 40-50 °C (por exemplo, 45 °C), opcionalmente a vácuo. Uma quantidade que pode ser dissolvida de dextrano seco é dissolvida em sulfóxido de dimetila (DMSO) ou DMSO/5% LiCl, após o quê todos os grupos hidroxila livres são metilados (por exemplo, por meio de adição sequencial de uma calda de NaOH/DMSO seguida por iodometano). O dextrano metilado é extraído em seguida (por exemplo, em cloreto de metileno) e hidrolisado em unidades monoméricas, utilizando ácido

trifluoroacético (TFA) aquoso a cerca de 110-125 °C (por exemplo, 120 °C). TFA é evaporado em seguida e realiza-se abertura de anéis redutores utilizando borodeutereto de sódio. Os grupos hidroxila criados por meio de hidrólise das ligações glicosídicas são acetilados em seguida por meio de tratamento com cloreto de acetila e TFA sob temperatura de cerca de 40-60 °C (por exemplo, 50 °C). Em seguida, os reagentes derivantes são evaporados e os monômeros metilados/acetilados resultantes são reconstituídos em acetonitrila; essa preparação é analisada em seguida por meio de GC/MS utilizando uma coluna apropriada (por exemplo, biscianopropil cianopropilfenil polissiloxano). O posicionamento relativo das funcionalidades metila e acetila fornecem substâncias com espectros de massa e índices de tempo de retenção distintos que podem ser comparados com bancos de dados publicados. Desta forma, os derivados das unidades monoméricas indicam como cada monômero foi ligado originalmente no polímero de dextrano.

[0088] Acredita-se que dextrano no presente possa ser uma estrutura ramificada na qual existem cadeias longas (que contêm, no todo ou em sua maioria, ligações alfa-1,6) que se ramificam iterativamente entre si (uma cadeia longa pode, por exemplo, ser um ramo de outra cadeia longa, que, por sua vez, pode ser um ramo de outra cadeia longa e assim por diante). A estrutura ramificada pode também compreender ramos curtos das cadeias longas; acredita-se que essas cadeias curtas compreendam, em sua maioria, por exemplo, ligações alfa-1,3 e 1,4. Pontos de ramificação no dextrano, seja de ramificação de cadeia longa de outra cadeia longa ou ramificação de cadeia curta de uma cadeia longa, aparentemente compreendem ligações alfa-1,3, 1,4 ou 1,2 de uma glicose envolvida em ligação alfa-1,6. Em média, cerca de 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 15-35%, 15-30%, 15-25%, 15-20%, 20-35%, 20-30%, 20-25%, 25-35% ou 25-30% de todos os pontos de ramificação de dextrano em algumas realizações ramificam-se em cadeias

longas. A maior parte (>98% ou 99%) ou todos os outros pontos de ramificação ramificam-se em cadeias curtas.

[0089] As cadeias longas de uma estrutura de ramificação de dextrano podem ter comprimento similar em alguns aspectos. Por comprimento similar, indica-se que o comprimento (DP) de pelo menos 70%, 75%, 80%, 85% ou 90% de todas as cadeias longas em uma estrutura de ramificação encontra-se em mais/menos 15% (ou 10%, ou 5%) do comprimento médio de todas as cadeias longas da estrutura de ramificação. Em alguns aspectos, o comprimento médio das cadeias longas é de cerca de 10-50 DP (ou seja, 10-50 monômeros de glicose). O comprimento individual médio das cadeias longas pode ser, por exemplo, de cerca de 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 10-50, 10-40, 10-30, 10-25, 10-20, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, 15-20, 20-50, 20-40, 20-30 ou 20-25 DP.

[0090] Cadeias longas de dextrano em certas realizações podem compreender substancialmente ligações alfa-1,6 glicosídicas e uma pequena quantidade (menos de 2,0%) de ligações alfa-1,3 e/ou alfa-1,4 glicosídicas. Cadeias longas de dextrano podem compreender, por exemplo, cerca ou pelo menos cerca de 98%, 98,25%, 98,5%, 98,75%, 99%, 99,25%, 99,5%, 99,75% ou 99,9% de ligações alfa-1,6 glicosídicas. Cadeia longa de dextrano, em certas realizações, não compreende ligações alfa-1,4 glicosídicas (ou seja, essa cadeia longa possui principalmente ligações alfa-1,6 e uma pequena quantidade de ligações alfa-1,3). Por outro lado, cadeia longa de dextrano, em algumas realizações, não compreende ligações alfa-1,3 glicosídicas (ou seja, essa cadeia longa possui principalmente ligações alfa-1,6 e uma pequena quantidade de ligações alfa-1,4). Qualquer cadeia longa de dextrano das realizações acima pode adicionalmente não compreender, por exemplo, ligações alfa-1,2 glicosídicas. Ainda em alguns aspectos, uma cadeia longa de dextrano pode compreender 100% de ligações alfa-1,6 glicosídicas (exceto pela ligação

utilizada por essa cadeia longa para ramificar-se de outra cadeia).

[0091] Cadeias curtas de uma molécula de dextrano, em alguns aspectos, possuem de um a três monômeros de glicose de comprimento e compreendem menos de cerca de 5-10% de todos os monômeros de glicose do polímero de dextrano. Pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou todas as cadeias curtas do presente são monômeros com 1-3 glicoses de comprimento. As cadeias curtas de uma molécula de dextrano podem, por exemplo, compreender menos de cerca de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% de todos os monômeros de glicose da molécula de dextrano.

[0092] Cadeias curtas de uma molécula de dextrano, em alguns aspectos, podem compreender ligações alfa-1,2 alfa-1,3 e/ou alfa-1,4 glicosídicas. Cadeias curtas, quando consideradas todas juntas (não individualmente) podem compreender, por exemplo, (i) todas as três dessas ligações ou (ii) ligações alfa-1,3 e alfa-1,4 glicosídicas. Acredita-se que cadeias curtas de uma molécula de dextrano do presente possam ser heterogêneas (ou seja, exibem alguma variação do perfil de ligação) ou homogêneas (ou seja, compartilham perfil de ligação idêntico ou similar) com relação às outras cadeias curtas do dextrano.

[0093] Dextrano em certas realizações podem ter Mw de cerca ou pelo menos cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 ou 200 milhões (ou qualquer número inteiro de 50 a 200 milhões) (ou qualquer faixa entre dois desses valores). O Mw de dextrano pode ser, por exemplo, de cerca de 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 110-200, 120-200, 50-180, 60-180, 70-180, 80-180, 90-180, 100-180, 110-180, 120-180, 50-160, 60-160, 70-160, 80-160, 90-160, 100-160, 110-160, 120-160, 50-140, 60-140, 70-140, 80-140, 90-140, 100-140, 110-140, 120-140, 50-120, 60-120, 70-120,

80-120, 90-120, 100-120, 110-120, 50-110, 60-110, 70-110, 80-110, 90-110, 100-110, 50-100, 60-100, 70-100, 80-100, 90-100 ou 95-105 milhões. Qualquer um desses MWs pode ser representado em DPw, se desejado, dividindo-se Mw por 162,14.

[0094] O raio médio z de giração de dextrano no presente pode ser de cerca de 200-280 nm. O Rg médio z pode ser, por exemplo, de cerca de 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ou 280 nm (ou qualquer número inteiro de 200 a 280 nm). Como em outros exemplo, o Rg médio z pode ser de cerca de 200-280, 200-270, 200-260, 200-250, 200-240, 200-230, 220-280, 220-270, 220-260, 220-250, 220-240, 220-230, 230-280, 230-270, 230-260, 230-250, 230-240, 240-280, 240-270, 240-260, 240-250, 250-280, 250-270 ou 250-260 nm.

[0095] O Rg médio z e/ou Mw de dextrano, em alguns aspectos, pode ser medido seguindo-se um protocolo similar ou idêntico ao protocolo descrito no Exemplo 9. Mw e/ou Rg médio z no presente podem ser medidos, por exemplo, por meio de dissolução, em primeiro lugar, de dextrano produzido por 0768 gtf a 0,4-0,6 mg/ml (por exemplo, cerca de 0,5 mg/ml) em 0,05-1,0 M (por exemplo, cerca de 0,075 M) de tampão tris(hidroximetil)aminometano com 150-250 ppm (por exemplo, cerca de 200 ppm) de  $\text{NaN}_3$ . Pode-se atingir solvatação de dextrano seco por meio de agitação por 12-18 horas a 45-55 °C (por exemplo, cerca de 50 °C). A solução de dextrano resultante pode ser introduzida em um aparelho cromatográfico de injeção de fluxo apropriado que compreende um módulo de separação (por exemplo, módulo de separação Alliance® 2695 da Waters Corporation, Milford MA) acoplado a três detectores online: refratômetro diferencial (por exemplo, detector de índice de refração Waters 2414), fotômetro de difusão de luz multiangular (MALS) (por exemplo, fotômetro MALS multiangular com 18 ângulos Heleos® 2) equipado com detector de difusão de luz semielástico (QELS) (por exemplo, detector QELS da Wyatt

Technologies, Santa Barbara CA) e viscosímetro capilar diferencial (por exemplo, viscosímetro capilar diferencial ViscoStar® da Wyatt). Duas colunas de exclusão de tamanho apropriadas (por exemplo, colunas AQUAGEL-OH GUARD da Agilent Technologies, Santa Clara CA) podem ser utilizadas para separar o pico de polímero de dextrano do pico de injeção, em que a fase móvel pode ser a mesma do solvente de amostra (acima), a velocidade de fluxo pode ser de cerca de 0,2 ml/min, os volumes de injeção podem ser de cerca de 0,1 ml e a temperatura de coluna pode ser de cerca de 30 °C. Pode-se utilizar software apropriado para obtenção de dados (por exemplo, software Empower® versão 3 da Waters) e para redução de dados de multidetector (software Astra® versão 6 da Wyatt). Dados de MALS podem fornecer peso molecular ponderal médio (Mw) e raio de giração médio z (Rg) e os dados de QELS podem fornecer, por exemplo, raio hidrodinâmico médio z.

[0096] Dextrano no presente pode ser um produto de uma enzima glicosiltransferase que compreende ou consiste de uma sequência de aminoácidos que é 100% idêntica ou pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 13 ou SEQ ID N° 17 (e possui atividade gtf). Exemplos não limitadores de enzima glicosiltransferase que compreende SEQ ID N° 1 (ou uma sequência relacionada) incluem enzimas de glicosiltransferase que compreendem ou consistem de uma sequência de aminoácidos que é 100% idêntica ou pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a SEQ ID N° 2 (e possuem atividade de gtf). A produção de dextrano pode ser realizada, por exemplo, com reação de gtf conforme descrito no presente. Dextrano, conforme descrito na presente descrição detalhada (por exemplo, peso molecular, ligação e perfil de ramificação), pode ser opcionalmente caracterizado como produto de uma enzima glicosiltransferase que compreende ou consiste de SEQ ID N° 1 ou 2 (ou uma de suas sequências



relacionadas que é pelo menos 90% idêntica (acima)). Em algumas outras realizações, enzima glicosiltransferase compreende ou consiste de uma sequência de aminoácidos que é 100% idêntica ou pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à parte secretada (ou seja, peptídeo de sinal removido) da sequência de aminoácidos codificada por SEQ ID Nº 6, 10, 14 ou 18.

[0097] Enzima glicosiltransferase no presente pode ter várias fontes microbianas, tais como bactérias ou fungos. Exemplos de enzimas glicosiltransferase bacterianas são as derivadas de uma espécie de *Streptococcus*, espécie de *Leuconostoc*, espécie de *Lactobacillus* ou espécie de *Weissella*. Exemplos de espécies de *Streptococcus* incluem *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. salivarius*, *S. dentirousetti*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. gallolyticus* e *S. sanguinis*. Exemplos de espécies de *Leuconostoc* incluem *L. pseudomesenteroides*, *L. mesenteroides*, *L. amelibiosum*, *L. argentinum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. cremoris*, *L. dextranicum* e *L. fructosum*. Exemplos de espécies de *Lactobacillus* incluem *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. brevis*, *L. buchneri* e *L. reuteri*. Exemplos de espécies de *Weissella* incluem *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. kandleri*, *W. kimchii*, *W. koreensis*, *W. minor*, *W. paramesenteroides*, *W. soli* e *W. thailandensis*. Glicosiltransferase, em alguns aspectos, não é de *L. mesenteroides*.

[0098] Exemplos de enzimas de glicosiltransferase no presente podem ser de quaisquer das sequências de aminoácidos descritas no presente e incluem adicionalmente 1-300 (ou qualquer número inteiro entre eles (por exemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50)) resíduos sobre o terminal N e/ou terminal C. Esses resíduos adicionais podem ser, por exemplo, de uma sequência do tipo selvagem correspondente da qual é derivada a enzima glicosiltransferase ou podem ser uma sequência heteróloga, tal como uma marca

de epítopo (no terminal N ou C) ou um peptídeo de sinal heterólogo (no terminal N).

[0099] Uma enzima glicosiltransferase utilizada para produzir dextrano no presente encontra-se tipicamente em forma madura, que não possui um peptídeo de sinal N-terminal. Um sistema de expressão para produzir uma enzima glicosiltransferase madura no presente pode empregar um polinucleotídeo codificador de enzima que compreende adicionalmente uma sequência que codifica um peptídeo de sinal N-terminal para dirigir a secreção extracelular. O peptídeo de sinal nessas realizações é dividido da enzima durante o processo de secreção. O peptídeo de sinal pode ser nativo ou heterólogo para a glicosiltransferase. Um exemplo de peptídeo de sinal útil no presente é uma dentre espécies bacterianas (por exemplo, espécie de *Bacillus*, tal como *B. subtilis*) ou fúngicas. Um exemplo de peptídeo de sinal bacteriano é um peptídeo de sinal aprE, tal como de *Bacillus* (por exemplo, *B. subtilis*; vide Vogtentanz et al, *Protein Expr. Purif.* 55: 40-52, que é incorporado ao presente como referência).

[00100] SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 9, SEQ ID Nº 13 e SEQ ID Nº 17 são exemplos de enzimas de glicosiltransferase maduras que não contêm um peptídeo de sinal N-terminal. Como estas sequências de aminoácidos e relacionadas não começam com um resíduo de metionina, compreender-se-ia que uma metionina inicial N-terminal é preferencialmente adicionada à sequência (diretamente ou por meio de uma sequência de aminoácidos heterólogos interveniente tal como um epítopo) caso a expressão de qualquer uma dessas enzimas sem utilizar um peptídeo de sinal (tal como com um sistema de expressão no qual a enzima é expressa de forma intracelular e obtida de um lisato celular).

[00101] Uma enzima glicosiltransferase, em certas realizações, pode ser produzida por qualquer meio conhecido na técnica. Enzima

glicosiltransferase pode, por exemplo, ser produzida de forma recombinante em um sistema de expressão heterólogo, tal como um sistema de expressão heterólogo microbiano. Exemplos de sistemas de expressão heterólogos incluem sistemas de expressão bacterianos (por exemplo, *E. coli*, tal como TOP10, MG1655 ou BL21 DE3; *Bacillus* sp, tal como *B. subtilis*) e eucarióticos (por exemplo, leveduras tais como *Pichia* sp e *Saccharomyces* sp).

[00102] Uma enzima glicosiltransferase descrita no presente pode ser utilizada em qualquer estado de purificação (por exemplo, puro ou impuro). A enzima glicosiltransferase pode, por exemplo, ser purificada e/ou isolada antes do seu uso. Exemplos de enzimas glicosiltransferase que são impuras incluem aquelas na forma de lisato celular. Extrato ou lisato celular pode ser preparado a partir de uma bactéria (por exemplo, *E. coli*) utilizada para expressar a enzima de forma heteróloga. A bactéria pode ser submetida a rompimento, por exemplo, utilizando uma célula de pressão francesa. Em realizações alternativas, bactérias podem ser homogeneizadas com um homogeneizador (por exemplo, APV, Rannie, Gaulin). Uma enzima glicosiltransferase é tipicamente solúvel nesses tipos de preparações. Um lisato, extrato ou homogeneizado de células bacterianas no presente pode ser utilizado a cerca de 0,15-0,3% (v/v) em uma reação para produzir dextrano a partir de sacarose.

[00103] Um sistema de expressão genética heterólogo para expressar uma enzima glicosiltransferase no presente pode ser projetado, por exemplo, para secreção de proteínas. Uma enzima glicosiltransferase tipicamente compreende um peptídeo de sinal nessas realizações. Enzima glicosiltransferase, em algumas realizações, não ocorre na natureza; não se acredita, por exemplo, que uma enzima de acordo com o presente seja aquela que é secretada naturalmente (ou seja, forma madura) de micróbios (dos quais a enzima glicosiltransferase do presente poderia possivelmente haver sido derivada).

[00104] A atividade de enzima glicosiltransferase do presente pode ser determinada utilizando qualquer método conhecido na técnica. A atividade da enzima glicosiltransferase pode ser determinada, por exemplo, por meio de medição da produção de açúcares redutores (frutose e glicose) em uma reação que contém sacarose (cerca de 50 g/l), dextrano T10 (cerca de 1 mg/ml) e tampão fosfato de potássio (pH de cerca de 6,5, 50 mM), em que a solução é mantida a cerca de 22-25 °C por cerca de 24-30 horas. Os açúcares redutores podem ser medidos por meio da adição de 0,01 ml da reação a uma mistura que contém cerca de 1 N NaOH e cerca de 0,1% de cloreto de trifeniltetrazólio e monitoramento do aumento da absorção a OD<sub>480nm</sub> por cerca de cinco minutos. Além disso, por exemplo, uma unidade de enzima tal como gtf 0768 (que compreende SEQ ID N° 1) do presente pode ser definida como a quantidade de enzima necessária para consumir 1 g de sacarose em uma hora a 26 °C, pH 6,5 e com 100 g/l de sacarose.

[00105] Dextrano, conforme descrito no presente, pode ser um produto de glicosiltransferase, conforme compreendido em uma reação de glicosiltransferase.

[00106] A temperatura de uma reação de glicosiltransferase no presente pode ser controlada, se desejado. Em certas realizações, a temperatura é de cerca de 5 °C a cerca de 50 °C. A temperatura em algumas outras realizações é de cerca de 20 °C a cerca de 40 °C. Alternativamente, a temperatura pode ser de cerca de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 °C. A temperatura de reação de glicosiltransferase no presente pode ser mantida utilizando diversos meios conhecidos na técnica. A temperatura pode ser mantida, por exemplo, colocando-se o recipiente que contém a reação em um incubador de banho de água ou ar configurado à temperatura desejada.

[00107] A concentração inicial de sacarose em uma reação de

glicosiltransferase no presente pode ser de cerca de 20 g/l a 900 g/l, 20 g/l a 400 g/l, 75 g/l a 175 g/l ou 50 g/l a 150 g/l. A concentração inicial de sacarose pode ser, por exemplo, de cerca de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 50-150, 75-125, 90-110, 50-500, 100-500, 200-500, 300-500, 400-500, 50-400, 100-400, 200-400, 300-400, 50-300, 100-300, 200-300, 50-200, 100-200 ou 50-100 g/l (ou qualquer número inteiro de 20 a 900 g/l). “Concentração inicial de sacarose” designa a concentração de sacarose em uma reação gtf pouco depois da adição de todos os componentes de reação (pelo menos água, sacarose e enzima glicosiltransferase).

[00108] Sacarose utilizada em uma reação de glicosiltransferase no presente pode ter alta pureza ( $\geq 99,5\%$ ) ou qualquer outro grau ou pureza. Sacarose pode ter, por exemplo, pureza de pelo menos 99,0% ou pode ser sacarose em grau de reagente. Como outro exemplo, pode-se utilizar sacarose incompletamente refinada. Sacarose incompletamente refinada no presente designa sacarose que não tenha sido processada em sacarose refinada branca. Sacarose incompletamente refinada pode, portanto, ser completamente não refinada ou parcialmente refinada. Exemplos de sacarose não refinada são “sacarose bruta” (“açúcar bruto”) e suas soluções. Exemplos de sacarose parcialmente refinada não passaram através de uma, duas, três ou mais etapas de cristalização. A ICUMSA (Comissão Internacional de Métodos Uniformes de Análise de Açúcar) de sacarose incompletamente refinada no presente pode ser, por exemplo, de mais de 150. Sacarose no presente pode ser derivada de qualquer fonte de açúcar renovável, tal como cana de açúcar, beterraba, mandioca, sorgo doce ou milho. Formas apropriadas de sacarose úteis no presente são, por exemplo, forma cristalina ou não cristalina (por exemplo, xarope, caldo de cana e suco de beterraba). Formas apropriadas adicionais de sacarose incompletamente refinada são descritas no Pedido de Patente Norte-

Americano publicado nº 2015/0275256, que é incorporado ao presente como referência.

[00109] Métodos de determinação de valores ICUMSA para sacarose são bem conhecidos na técnica e descritos pela Comissão Internacional de Métodos Uniformes de Análise de Açúcar em *ICUMSA Methods of Sugar Analysis: Official and Tentative Methods Recommended by the International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA)* (Ed. H. C. S. de Whalley, Elsevier Pub. Co., 1964), por exemplo, que é incorporado ao presente como referência. ICUMSA pode ser medido, por exemplo, por meio do Método ICUMSA GS1/3-7 conforme descrito por R. J. McCowage, R. M. Urquhart e M. L. Burge (*Determination of the Solution Colour of Raw Sugars, Brown Sugars and Coloured Syrups at pH 7.0 – Official*, Verlag Dr. Albert Bartens, revisão de 2011), que é incorporado ao presente como referência.

[00110] O pH de uma reação de glicosiltransferase em certas realizações pode ser de cerca de 4,0 a cerca de 8,0. Alternativamente, o pH pode ser de cerca de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ou 8,0. O pH pode ser ajustado ou controlado por meio da adição ou incorporação de um tampão apropriado, incluindo, mas sem limitações: fosfato, tris, citrato ou uma de suas combinações. Concentração de tampão em reação de gtf pode ser, por exemplo, de 0 mM a cerca de 100 mM ou cerca de 10, 20 ou 50 mM.

[00111] A reação de glicosiltransferase pode estar contida em qualquer recipiente apropriado para aplicação de uma ou mais das condições de reação descritas no presente. Reação de glicosiltransferase no presente pode encontrar-se, por exemplo, em um recipiente ou veículo de aço inoxidável, plástico ou vidro com tamanho apropriado para conter uma reação específica. Esse recipiente pode ser opcionalmente equipado com um dispositivo de agitação.

[00112] Reação de glicosiltransferase no presente pode ser

opcionalmente agitada, por exemplo, por meio de agitação ou agitação orbital. Essa agitação pode ser realizada, por exemplo, a cerca de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 50-150, 60-140, 70-130, 80-120 ou 90-110 rpm.

[00113] A concentração de enzima glicosiltransferase em uma reação pode ser, por exemplo, de pelo menos cerca de 15, 20, 25, 30, 35 ou 40 U/l. Em algumas realizações, pode-se utilizar 15-35, 15-30, 15-25, 20-35, 20-30, 20-25, 25-35, 25-30 ou 30-35 U/l de glicosiltransferase.

[00114] A reação de glicosiltransferase do presente pode levar cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 18-30, 20-28 ou 22-26 horas para o término. O tempo de reação pode depender, por exemplo, de certos parâmetros tais como a quantidade de sacarose e enzima glicosiltransferase utilizada na reação.

[00115] Todas as características do presente que definem uma reação de glicosiltransferase podem ser adequadamente combinadas. Simplesmente na forma de exemplo, uma reação utilizando glicosiltransferase 0768 (que compreende SEQ ID N° 1 ou uma de suas sequências relacionadas) pode conter inicialmente 90-110 g/l (por exemplo, cerca de 100 g/l) de sacarose, 10-30 mM (por exemplo, cerca de 20 mM) de tampão fosfato de sódio sob pH 6,0-7,0 (por exemplo, pH de cerca de 6,5) e 20-30 U/l (por exemplo, cerca de 25 U/l) de enzima. Essa reação pode ser mantida por cerca de 20-28 horas (por exemplo, cerca de 24 horas) com agitação a 50-150 rpm (por exemplo, cerca de 100 rpm) a 24-28 °C (por exemplo, cerca de 26 °C).

[00116] Em algumas realizações, uma reação de glicosiltransferase que compreende uma enzima gtf 0768 (SEQ ID N° 1 ou sequências relacionadas) e qualquer quantidade de sacarose descrita no presente pode ser completa (por exemplo, 95% ou mais da sacarose inicialmente fornecida esgotados) em menos de cerca de 24, 22, 20, 18 ou 16 horas após o início da reação. O esgotamento de sacarose nessa reação pode ser cerca ou pelo menos

cerca de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 vezes mais rápido que reação idêntica ou similar, mas que compreende, por exemplo, uma dextrano sucrose de *Leuconostoc mesenteroides* no lugar de uma enzima gtf 0768.

[00117] Uma composição que compreende dextrano no presente pode ser não aquosa (por exemplo, composição seca). Exemplos dessas realizações incluem pós, grânulos, microcápsulas, flocos ou qualquer outra forma de matéria particulada. Outros exemplos incluem composições maiores, tais como pelotas, barras, sementes, esferas, pastilhas, bastões ou outros aglomerados. Uma composição seca ou não aquosa no presente contém tipicamente menos de 3, 2, 1, 0,5 ou 0,1% em peso de água nela compreendida. A quantidade de dextrano no presente em composição seca ou não aquosa pode ser, por exemplo, de cerca ou pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 ou 99,9% em peso. Uma composição não aquosa no presente pode apresentar-se, por exemplo, na forma de produto doméstico, produto de cuidados pessoais, produto farmacêutico, produto industrial ou produto alimentício.

[00118] Em certas realizações da presente invenção, uma composição que compreende dextrano pode ser uma composição aquosa que possui viscosidade de cerca ou pelo menos cerca de 25 cPs. Alternativamente, uma composição aquosa do presente pode possuir, por exemplo, viscosidade de cerca ou pelo menos cerca de 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000 ou 50000 cPs (ou qualquer número inteiro de 25 a 50000 cPs). Exemplos



de composições aquosas incluem hidrocoloides e soluções aquosas.

[00119] A viscosidade pode ser medida com uma composição aquosa no presente em qualquer temperatura de cerca de 3 °C a cerca de 110 °C (ou qualquer número inteiro de 3 a 110 °C). Alternativamente, a viscosidade pode ser medida, por exemplo, sob temperatura de cerca de 4 °C a 30 °C ou cerca de 20 °C a 25 °C. A viscosidade pode ser medida à pressão atmosférica (cerca de 760 torr) ou qualquer outra pressão, mais alta ou mais baixa.

[00120] A viscosidade de uma composição aquosa descrita no presente pode ser medida utilizando um viscosímetro ou reômetro, ou empregando qualquer outro meio conhecido na técnica. Os técnicos no assunto compreenderão que um viscosímetro ou reômetro pode ser utilizado para medir a viscosidade de composições aquosas do presente que exibem comportamento reológico (ou seja, que possuem viscosidades que variam com as condições de fluxo). A viscosidade dessas realizações pode ser medida, por exemplo, em velocidade de corte de rotação de cerca de 0,1 a 1000 rpm (revoluções por minuto). Alternativamente, a viscosidade pode ser medida em velocidade de corte de rotação de cerca de 10, 60, 150, 250 ou 600 rpm.

[00121] Em certas realizações, a viscosidade pode ser medida com uma composição aquosa na qual o componente dextrano foi sintetizado. A viscosidade pode ser medida, por exemplo, para uma reação de gtf do presente que se encontra no término ou perto do término. A viscosidade pode ser medida, portanto, com uma composição aquosa na qual o componente dextrano não é purificado (por exemplo, outros componentes da composição, além de água, estão presentes em mais de 1, 5 ou 10% em peso); essa composição pode conter um ou mais sais, tampões, proteínas (por exemplo, enzimas gtf) ou açúcares (por exemplo, frutose, glicose, leucrose e oligossacarídeos).

[00122] O pH de uma composição aquosa descrita no presente pode ser, por exemplo, de cerca de 2,0 a cerca de 12,0. Alternativamente, o pH

pode ser, por exemplo, de cerca de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 ou 12,0; ou de 5,0 a cerca de 12,0; ou cerca de 4,0 a 8,0; ou cerca de 5,0 a 8,0.

[00123] Uma composição aquosa do presente, tal como solução aquosa ou hidrocoloide, pode compreender um solvente que contém cerca ou pelo menos cerca de 10% em peso de água. Em outras realizações, o solvente é, por exemplo, cerca ou pelo menos cerca de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100% em peso de água (ou qualquer valor inteiro de 10 a 100% em peso).

[00124] Dextrano no presente pode estar presente em composição aquosa, por exemplo, em percentual em peso de cerca ou pelo menos cerca de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 ou 90% em peso. O Exemplo 8 abaixo demonstra que dextrano, em certos aspectos, fornece alta viscosidade a soluções aquosas sob concentrações relativamente baixas do dextrano. Certas realizações da presente invenção referem-se, portanto, a composições aquosas com menos de cerca de 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0,5% em peso de dextrano no presente.

[00125] Uma composição aquosa no presente pode compreender outros componentes além de dextrano. Uma composição aquosa pode compreender, por exemplo, um ou mais sais tais como sal de sódio (por exemplo, NaCl ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Outros exemplos não limitadores de sais incluem aqueles que contêm (i) um cátion de alumínio, amônio, bário, cálcio, cromo (II ou III), cobre (I ou II), ferro (II ou III), hidrogênio, chumbo (II), lítio, magnésio, manganês (II ou III), mercúrio (I ou II), potássio, prata, sódio, estrôncio, estanho (II ou IV) ou zinco; e (ii) um ânion de acetato, borato, bromato, brometo, carbonato, clorato, cloreto,

clorito, cromato, cianameto, cianeto, dicromato, di-hidrogênio fosfato, ferricianeto, ferrocianeto, fluoreto, hidrogênio carbonato, hidrogênio fosfato, hidrogênio sulfato, hidrogênio sulfeto, hidrogênio sulfito, hidreto, hidróxido, hipoclorito, iodato, iodeto, nitrato, nitreto, nitrito, oxalato, óxido, perclorato, permanganato, peróxido, fosfato, fosfeto, fosfito, silicato, estanhato, estanhito, sulfato, sulfeto, sulfito, tartarato ou tiocianato. Qualquer sal que contenha um cátion de (i) acima e um ânion de (ii) acima pode, portanto, estar, por exemplo, em uma composição aquosa. Um sal pode estar presente em uma composição aquosa no presente, por exemplo, em percentual em peso de cerca de 0,01 a cerca de 10,00 (ou qualquer centésimo de aumento de 0,01 a 10,00).

[00126] Uma composição de acordo com o presente pode conter opcionalmente uma ou mais enzimas ativas. Exemplos não limitadores de enzimas apropriadas incluem proteases, celulasas, hemicelulasas, peroxidases, enzimas lipolíticas (por exemplo, enzimas metalolipolíticas), xilanases, lipases, fosfolipases, esterases (por exemplo, arilesterase, poliesterase), per-hidrolases, cutinases, pectinases, liases de pectato, mananases, queratinases, reductases, oxidases (por exemplo, colino oxidase), fenoloxidasas, lipoxigenases, ligninases, pululanases, tanases, pentosanases, malanases, beta-glucanases, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacases, metaloproteinases, amadoriasas, glicoamilases, arabinofuranosidasas, fitases, isomerases, transferases e amilases. Caso sejam incluídas uma ou mais enzimas, ela(s) pode(m) ser compreendida(s) em uma composição do presente, por exemplo, a cerca de 0,0001-0,1% em peso (por exemplo, 0,01-0,03% em peso) de enzima ativa (calculada, por exemplo, como proteína de enzima pura).

[00127] Celulase no presente pode possuir atividade de endocelulase (EC 3.2.1.4), atividade de exocelulase (EC 3.2.1.91) ou atividade de celobiase (EC 3.2.1.21). Celulase no presente é “celulase ativa” que possui atividade sob condições apropriadas para manter a atividade de celulase; a

determinação dessas condições apropriadas encontra-se dentro do conhecimento da técnica.

[00128] Celulase no presente pode ser derivada de qualquer fonte microbiana, tal como bactéria ou fungo. São incluídas celulasas quimicamente modificadas ou celulasas mutantes elaboradas por proteínas. Celulasas apropriadas incluem, mas sem limitações, celulasas dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia* e *Acremonium*. Como outros exemplos, celulase pode ser derivada de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* ou *Fusarium oxysporum*; estas e outras celulasas são descritas nas Patentes Norte-Americanas nº 4.435.307, 5.648.263, 5.691.178, 5.776.757 e 7.604.974, todas as quais são incorporadas ao presente como referência. Exemplos de celulasas de *Trichoderma reesei* são descritos nas Patentes Norte-Americanas nº 4.689.297, 5.814.501 e 5.324.649, e nos Pedidos de Patente Internacionais publicados nº WO 92/06221 e WO 92/06165, todos os quais são incorporados ao presente como referência. Exemplos de celulasas de *Bacillus* são descritos na Patente Norte-Americana nº 6.562.612, que é incorporada ao presente como referência. Celulase, tal como qualquer dos acima, encontra-se preferencialmente em forma madura que não contém um peptídeo de sinal N-terminal. Celulasas disponíveis comercialmente úteis no presente incluem CELLUZYME® e CAREZYME® (Novozymes A/S); CLAZINASE® e PURADAX® HA (DuPont Industrial Biosciences) e KAC-500(B)® (Kao Corporation).

[00129] Alternativamente, a celulase do presente pode ser produzida por qualquer meio conhecido na técnica, tal como conforme descrito nas Patentes Norte-Americanas nº 4.435.307, 5.776.757 e 7.604.974, que são incorporadas ao presente como referência. Celulase pode ser produzida de forma recombinante, por exemplo, em um sistema de expressão heterólogo, tal como um sistema de expressão heterólogo microbiano ou fúngico. Exemplos de

sistemas de expressão heterólogos incluem sistemas bacterianos (por exemplo, *E. coli*, *Bacillus* sp) e eucarióticos. Sistemas eucarióticos podem empregar, por exemplo, sistemas de expressão de leveduras (por exemplo, *Pichia* sp e *Saccharomyces* sp) ou fúngicos (por exemplo, *Trichoderma* sp, tal como *T. reesei*, espécies de *Aspergillus*, tais como *A. niger*).

[00130] Uma ou mais celulasas podem ser diretamente adicionadas como ingrediente durante a preparação de uma composição descrita no presente. Alternativamente, uma ou mais celulasas podem ser fornecidas indiretamente (inadvertidamente) na composição descrita. Celulase, por exemplo, pode ser fornecida em uma composição do presente em virtude da presença em uma preparação de enzima não de celulase utilizada para preparar uma composição. Celulase, em composições nas quais celulase é fornecida indiretamente, pode estar presente, por exemplo, a cerca de 0,1-10 ppb (por exemplo, menos de 1 ppm). Um benefício contemplado de uma composição do presente, em virtude do emprego de um composto de dextrano, é que preparações de enzima não de celulase que poderão apresentar atividade de celulase de fundo podem ser utilizadas sem preocupação de que os efeitos desejados do dextrano serão negados pela atividade de celulase de fundo.

[00131] Celulase, em certas realizações, pode ser termoestável. A termoestabilidade de celulase designa a capacidade da enzima de reter atividade após exposição a uma temperatura elevada (por exemplo, cerca de 60-70 °C) por um período de tempo (por exemplo, cerca de 30-60 minutos). A termoestabilidade de celulase pode ser medida pela sua meia vida ( $t_{1/2}$ ) fornecida em minutos, horas ou dias, em que, durante esse período de tempo, a metade da atividade de celulase é perdida sob condições definidas.

[00132] Celulase, em certas realizações, pode ser estável a uma ampla série de valores de pH (por exemplo, pH neutro ou alcalino, tal como pH de cerca de 7,0 a cerca de 11,0). Essas enzimas podem permanecer estáveis

por um período de tempo previamente determinado (por exemplo, pelo menos cerca de quinze minutos, trinta minutos ou uma hora) sob essas condições de pH.

[00133] Pelo menos uma, duas ou mais celulasas podem ser incluídas na composição. A quantidade total de celulase em composição do presente é tipicamente uma quantidade que é apropriada para o propósito de uso de celulase na composição (“quantidade eficaz”). Uma quantidade eficaz de celulase em uma composição destinada a aprimorar a sensação e/ou aparência de um tecido que contém celulase, por exemplo, é uma quantidade que produz aprimoramentos mensuráveis da sensação do tecido (por exemplo, aprimorando a maciez e/ou aparência do tecido, removendo cápsulas e fibrilas que tendem a reduzir a nitidez da aparência do tecido). Como outro exemplo, quantidade eficaz de celulase em uma composição de lavagem com abrasivos para tecidos no presente é a quantidade que fornecerá o efeito desejado (por exemplo, para produzir aparência gasta e desbotada em costuras e painéis de tecido). A quantidade de celulase em uma composição de acordo com o presente pode também depender, por exemplo, dos parâmetros de processo nos quais a composição é empregada (por exemplo, equipamento, temperatura, tempo e similares) e da atividade de celulase. A concentração eficaz de celulase em uma composição aquosa na qual é tratado um tecido pode ser facilmente determinada pelos técnicos no assunto. Em processos de cuidados com tecidos, celulase pode estar presente em uma composição aquosa (por exemplo, líquido de lavagem) na qual o tecido é tratado em concentração que é, por exemplo, de, no mínimo, cerca de 0,01-0,1 ppm total de proteína de celulase ou cerca de 0,1-10 ppb total de proteína de celulase (por exemplo, menos de 1 ppm) até, no máximo, cerca de 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 ou 5000 ppm total de proteína de celulase.

[00134] Acredita-se que os polímeros de dextrano fornecidos no

presente sejam, no todo ou em sua maioria, estáveis (resistentes) à degradação por celulase. Acredita-se, por exemplo, que o percentual de degradação de dextrano no presente por uma ou mais celulases seja de menos de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou 0%. Esse percentual de degradação pode ser determinado, por exemplo, por meio de comparação do peso molecular de polímero de dextrano antes e depois do tratamento com celulase por um período de tempo (por exemplo, cerca de 24 horas).

[00135] Acredita-se que composições aquosas, em certas realizações, possuam comportamento de afinamento de corte ou comportamento de espessamento de corte. Comportamento de afinamento de corte é observado como redução da viscosidade da composição aquosa à medida que aumenta a velocidade de corte, enquanto comportamento de espessamento de corte é observado como aumento da viscosidade da composição aquosa à medida que aumenta a velocidade de corte. Modificação do comportamento de afinamento de corte ou comportamento de espessamento de corte de uma composição aquosa de acordo com o presente pode dever-se à mistura de dextrano à composição aquosa. Um ou mais compostos de dextrano de acordo com a presente invenção podem, portanto, ser adicionados a uma composição aquosa para modificar o seu perfil reológico (ou seja, as propriedades de fluxo de uma mistura, solução ou líquido aquoso são modificadas). Além disso, um ou mais compostos de dextrano podem ser adicionados a uma composição aquosa para modificar a sua viscosidade.

[00136] As propriedades reológicas de composições aquosas de acordo com o presente podem ser observadas por meio de medição da viscosidade ao longo de uma velocidade de corte de rotação crescente (por exemplo, cerca de 0,1 rpm a cerca de 1000 rpm). O comportamento de afinamento de corte de uma composição aquosa descrita no presente pode ser observado, por exemplo, na forma de redução da viscosidade (cPs) em cerca ou

pelo menos cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% (ou qualquer número inteiro de 5% a 95%) à medida que a velocidade de corte de rotação aumenta de cerca de 10 rpm para 60 rpm, 10 rpm para 150 rpm, 10 rpm para 250 rpm, 60 rpm para 150 rpm, 60 rpm para 250 rpm ou 150 rpm para 250 rpm. Como outro exemplo, o comportamento de espessamento de corte de uma composição aquosa descrita no presente pode ser observado na forma de aumento da viscosidade (cPs) em cerca ou pelo menos cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175% ou 200% (ou qualquer número inteiro de 5% a 200%) à medida que a velocidade de corte de rotação aumenta de cerca de 10 rpm para 60 rpm, 10 rpm para 150 rpm, 10 rpm para 250 rpm, 60 rpm para 150 rpm, 60 rpm para 250 rpm ou 150 rpm para 250 rpm.

[00137] A composição aquosa descrita no presente pode apresentar-se na forma de produto alimentício, produto de cuidado pessoal, produto farmacêutico, produto doméstico ou produto industrial, tal como qualquer um dos produtos descritos abaixo, e/ou ser neles compreendida. Os compostos de dextrano no presente podem ser utilizados como agentes espessantes em cada um desses produtos. Esse agente espessante pode ser utilizado em conjunto com um ou mais tipos diferentes de agentes espessantes, se desejado, tais como os descritos na Patente Norte-Americana nº 8.541.041, cujo relatório descritivo é integralmente incorporado ao presente como referência.

[00138] Acredita-se que os compostos de dextrano descritos no presente, sejam úteis, por exemplo, para fornecer uma ou mais das propriedades físicas a seguir para um produto de cuidados pessoais, produto farmacêutico, produto doméstico, produto industrial ou produto alimentício: espessamento, estabilidade de congelamento/descongelamento, lubricidade, retenção e liberação de umidade, textura, consistência, retenção de forma, emulsificação,



ligação, suspensão, dispersão, gelificação e redução da dureza mineral. Exemplos de concentração ou quantidade de dextrano em um produto podem ser, por exemplo, quaisquer dos percentuais em peso fornecidos no presente.

[00139] Os produtos de cuidados pessoais no presente não são particularmente limitados e incluem, por exemplo, composições de cuidado com a pele, composições cosméticas, composições antifúngicas e composições antibacterianas. Produtos de cuidados pessoais no presente podem apresentar-se na forma, por exemplo, de loções, cremes, pastas, bálsamos, unguentos, pomadas, géis, líquidos, suas combinações e similares. Os produtos de cuidados pessoais descritos no presente podem incluir pelo menos um ingrediente ativo, se desejado. Um ingrediente ativo é geralmente reconhecido como um ingrediente que produz efeito farmacológico pretendido.

[00140] Em certas realizações, o produto de cuidado com a pele pode ser aplicado à pele para cuidar de lesões da pele relativas à falta de umidade. Produtos de cuidado com a pele podem também ser utilizados para abordar a aparência visual da pele (por exemplo, reduzir a aparência de pele vermelha, rachada e/ou escamosa) e/ou a sensação tátil da pele (por exemplo, reduzir a aspereza e/ou seca da pele, mediante aumento da maciez e suavidade da pele). Produtos de cuidado com a pele podem tipicamente incluir pelo menos um ingrediente ativo para o tratamento ou prevenção de doenças da pele, fornecimento de efeito cosmético ou para fornecer benefício umectante à pele, tal como óxido de zinco, petrolato, petrolato branco, óleo mineral, óleo de fígado de bacalhau, lanolina, dimeticone, gordura dura, vitamina A, alantoína, calamina, caulim, glicerina ou farinha de aveia coloidal e suas combinações. Um produto de cuidado com a pele pode incluir um ou mais fatores umectantes naturais, tais como, por exemplo, ceramidas, ácido hialurônico, glicerina, esqualano, aminoácidos, colesterol, ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídios, glicosfingolipídios, ureia, ácido linoleico, glicosaminoglicanos,

mucopolissacarídeo, lactato de sódio ou pirrolidona carboxilato de sódio. Outros ingredientes que podem ser incluídos em um produto de cuidado com a pele incluem, sem limitações, glicerídeos, óleo de caroço de damasco, óleo de canola, esqualano, esqualeno, óleo de coco, óleo de milho, óleo de jojoba, cera de jojoba, lecitina, óleo de oliva, óleo de açafrão, óleo de gergelim, manteiga de carité, óleo de soja, óleo de amêndoa doce, óleo de girassol, óleo da árvore do chá, manteiga de carité, óleo de palma, colesterol, ésteres de colesterol, ésteres de cera, ácidos graxos e óleo de laranja.

[00141] Um produto de cuidados pessoais do presente pode também apresentar-se, por exemplo, na forma de maquiagem, batom, máscara, rouge, base, blush, delineador dos olhos, delineador dos lábios, brilho labial, outros cosméticos, filtro solar, bloqueador solar, esmalte de unhas, condicionador das unhas, gel de banho, gel de chuveiro, lavagem corporal, lavagem facial, bálsamo para os lábios, condicionador da pele, creme frio, umectante, pulverizador corporal, sabão, produto de esfoliação corporal, esfoliante, adstringente, loção para o pescoço, depilador, solução de ondulação permanente, formulação anticaspa, composição antitranspirante, desodorante, produto para barbear, produto pré-barbear, produto pós-barba, higienizante, gel para a pele, enxágue, composição de dentífrício, creme dental ou lavagem bucal. Um exemplo de produto de cuidados pessoais (por exemplo, higienizador, sabão, produto de esfoliação, cosmético) compreende um veículo ou agente de exfoliação (por exemplo, esferas de jojoba (esferas de éster de jojoba)) (por exemplo, cerca de 1-10, 3-7, 4-6 ou 5% em peso); esse agente pode ser opcionalmente ser disperso no produto.

[00142] Produtos de cuidados pessoais, em alguns aspectos, podem ser produtos de cuidados com os cabelos. Exemplos de produtos de cuidados com os cabelos no presente incluem xampu, condicionador capilar (com ou sem enxágue), creme rinse, tintura para os cabelos, produto de

coloração dos cabelos, produto de brilho para os cabelos, soro capilar, produto antifrisante para os cabelos, produto de reparo de pontas duplas dos cabelos, mousse, pulverizador capilar e gel de modelagem. Produtos de cuidados com os cabelos podem apresentar-se na forma de líquidos, pastas, géis, sólidos ou pós, em algumas realizações. Produtos de cuidados com os cabelos, conforme descrito no presente, compreendem tipicamente um ou mais dos ingredientes a seguir, que são geralmente utilizados para formular produtos de cuidados com os cabelos: tensoativos aniônicos, tais como polietilenolauril éter sulfato de sódio; tensoativos catiônicos, tais como cloreto de esteariltrimetilamônio e/ou cloreto de diesteariltrimetilamônio; tensoativos não iônicos, tais como monoestearato de glicerila, monopalmitato de sorbitan e/ou polioxietilenocetil éter; agentes umectantes, tais como propileno glicol, 1,3-butileno glicol, glicerina, sorbitol, sais de ácido piroglutâmico, aminoácidos e/ou trimetilglicina; hidrocarbonetos, tais como parafinas líquidas, petrolato, parafinas sólidas, esqualano e/ou oligômeros de olefina; álcoois superiores, tais como álcool estearílico e/ou álcool cetílico; agentes superengordurantes; agentes anticaspa; desinfetantes; agentes anti-inflamatórios; drogas brutas; polímeros hidrossolúveis, tais como metil celulose, hidroxiceulose e/ou chitina parcialmente desacetilada (além de um ou mais dextranos, conforme descrito no presente); antissépticos, tais como paraben; absorventes de luz ultravioleta; agentes perolizantes; agentes de ajuste do pH; perfumes; e pigmentos.

[00143] Produto farmacêutico no presente pode apresentar-se, por exemplo, na forma de emulsão, líquido, elixir, gel, suspensão, solução, creme ou unguento. Além disso, produto farmacêutico de acordo com o presente pode apresentar-se na forma de qualquer um dos produtos de cuidados pessoais descritos no presente, tais como composições antibacterianas ou antifúngicas. O produto farmacêutico pode compreender adicionalmente um ou mais veículos, diluentes e/ou sais farmaceuticamente aceitáveis. Compostos de dextran

descritos no presente podem também ser utilizados em cápsulas, encapsulantes, revestimentos de pastilhas e como excipientes para drogas e medicamentos.

[00144] Exemplos não limitadores de produtos alimentícios no presente incluem pastas de legumes, carne e soja; frutos do mar processados; palitos de queijo processados; sopas creme; caldos e molhos; molhos de salada; maionese; anéis de cebola; geleias, gelatinas e xaropes; recheios de tortas; produtos de batata, como batatas fritas e fritas extrudadas; massas para alimentos fritos, panquecas/waffles e bolos; ração animal; confeitos (doces); bebidas; sobremesas congeladas; sorvete; produtos lácteos cultivados, como queijo cottage, iogurte, queijos e cremes azedos; glacês e coberturas de bolos; coberturas batidas; produtos assados fermentados e não fermentados; e similares.

[00145] Em certas realizações, dextrano no presente pode ser compreendido em alimentos ou qualquer outro material ingerível (por exemplo, preparação farmacêutica enteral) em quantidade que forneça o grau desejado de espessamento e/ou dispersão. A concentração ou quantidade de dextrano em produtos pode ser, por exemplo, de cerca de 0,1-3% em peso, 0,1-4% em peso, 0,1-5% em peso ou 0,1-10% em peso.

[00146] Produtos domésticos e/ou industriais no presente podem apresentar-se na forma de compostos de junção de fita de drywalls; argamassas; rebocos; rebocos de cimento; rebocos pulverizados; cimento de juntas; adesivos; pastas, texturizadores de paredes e tetos; aglutinantes e auxiliares de processamento para formação de fitas, formação de extrusão, moldagem por injeção e cerâmica; aderentes de pulverização e auxiliares de suspensão/dispersão para pesticidas, herbicidas e fertilizantes; produtos de cuidados com tecidos tais como amolecedores de tecidos e detergentes de lavanderia; limpadores de superfícies duras; odorizadores de ambientes;

emulsões de polímeros; géis, tais como géis com base em água; soluções de tensoativo; tintas, tais como tintas com base em água; revestimentos protetores; adesivos; vedantes e giz; tintas, tais como tinta com base em água; fluidos de trabalho com metais; ou fluidos de limpeza de metais com base em emulsões utilizados, por exemplo, em operações de eletrorevestimento, fosfatização, galvanização e/ou limpeza geral de metais.

[00147] Compostos de dextrano descritos no presente podem ser compreendidos, por exemplo, em produtos de cuidados pessoais, produtos farmacêuticos, produtos domésticos ou produtos industriais em quantidade que forneça grau desejado de espessamento e/ou dispersão. Exemplos de concentração ou quantidade de composto de dextrano em um produto podem ser, por exemplo, quaisquer dos percentuais em peso fornecidos acima.

[00148] Composição aquosa, em alguns aspectos, pode compreender cerca de 0,5-2,0% em peso de dextrano no presente (por exemplo, cerca de 1,0% em peso), cerca de 15-25% em peso (por exemplo, cerca de 20% em peso) de umectante tal como óleo (por exemplo, óleo mineral), cerca de 4-6% em peso (cerca de 5% em peso) de tensoativo/emulsificante (por exemplo, um ou ambos dentre mono-oleato de sorbitan ou polissorbato 80, tal como cerca de 2,6% em peso de mono-oleato de sorbitan e cerca de 2,4% em peso de polissorbato 80), opcionalmente 0,25-1,0% em peso (por exemplo, 0,5% em peso) de conservante (por exemplo, conservante que compreende um ou mais dentre propileno glicol, diazolidinil ureia, metilparaben ou propilparaben (por exemplo, Germaben® II)) e, opcionalmente, um ou mais ingredientes diferentes. Essas composições podem apresentar-se, por exemplo, na forma de emulsão. Nestes e em alguns outros aspectos relacionados, dextrano conforme descrito no presente pode ser utilizado como substituto para compostos (por exemplo, goma xantana, polímeros de ácido acrílico reticulados tais como Carbopol® Ultrez 10) tipicamente utilizado para fornecer viscosidade a certos produtos de

consumo, tais como produtos de cuidados pessoais (por exemplo, loção), alimentícios e/ou farmacêuticos. Ainda em alguns aspectos, a avaliação de experiência sensorial de uma composição aquosa (por exemplo, item de cuidados pessoais tal como loção), conforme medido por meio de ASTM E 1490-3 (*Standard Practice for Descriptive Skinfeel Analysis of Creams and Lotions*, ASTM International, West Conshohocken PA, 2003, DOI: 10.1520/E1490-03, incorporado ao presente como referência), pode ser de menos de cerca de 8, 7 ou 6, em que cada uma dentre viscosidade de atrito, adesão posterior, sensação à retirada e viscosidade à retirada é medida na avaliação.

[00149] Produto alimentício no presente pode apresentar-se, por exemplo, na forma de confeito. Confeito no presente pode conter um ou mais açúcares (por exemplo, sacarose, frutose ou dextrose) para adoçar ou, de outra forma, ser livre de açúcar.

[00150] Exemplos de confeitos no presente incluem açúcares fervidos (doces fervidos duros (ou seja, doces duros), drágeas, doces em geleia, gomas, alcaçuz, mastigáveis, caramelos, toffee, fudge, gomas de mascar, chicles de bola, nougat, pastas mastigáveis, halawa, tabletes, pastilhas, coberturas, gelados, bolos e géis (por exemplo, géis de frutas e sobremesas de gelatina). Outros exemplos de confeitos incluem confeitos aerados, tais como marshmallow, e confeitos assados.

[00151] Os confeitos do presente podem ser opcionalmente preparados com chocolate, em qualquer forma (por exemplo, barras, doces, bombons, trufas e gotas). Confeitos podem ser revestidos, por exemplo, com chocolate, açúcar, doces, glacês e/ou películas. Os processos de revestimento com película compreendem tipicamente a aplicação à superfície do confeito de uma composição líquida formadora de película que se torna, depois de secar, uma película protetora. Esse revestimento com película serve, por exemplo, para proteger os princípios ativos contidos no confeito; para proteger o próprio

confeito contra a umidade, choques e/ou fragilidade; e/ou para conferir ao confeito propriedades visuais atraentes (por exemplo, brilho, cor uniforme e superfície macia).

[00152] Em certas realizações, os confeitos podem ser preenchidos com um recheio que é líquido, pastoso, sólido ou em pó. Dextrano, no presente, pode ser compreendido nesse recheio e, neste caso, o dextrano opcionalmente é também incluído no componente de confeito sendo recheado.

[00153] Os confeitos do presente são opcionalmente livres de açúcar, não contêm açúcar e tipicamente possuem um ou mais adoçantes artificiais e/ou não de açúcar (opcionalmente, não calóricos) (por exemplo, aspartame, sacarina, stevia e sucralose). Confeitos livres de açúcar podem compreender, em certas realizações, um ou mais polióis (por exemplo, eritritol, glicerol, lactitol, manitol, maltitol e xilitol), fibras solúveis e/ou proteínas no lugar de açúcar.

[00154] Produto alimentício no presente pode apresentar-se, por exemplo, na forma de ração animal. Ração animal no presente pode ser, por exemplo, alimento para animais domesticados, tais como cães ou gatos (ou qualquer outro animal de estimação). Ração animal, em certas realizações, fornece a animais domésticos um ou mais dos seguintes: exigências alimentares necessárias, guloseimas (por exemplo, biscoitos de cães) e suplementos alimentares. Exemplos de rações animais incluem ração animal seca (por exemplo, amêndoas e croquetes), composições seimúmidas e ração animal úmida (por exemplo, ração animal em latas) ou qualquer de suas combinações. Ração animal úmida tipicamente possui teor de umidade de mais de 65%. Ração animal semiúmida possui tipicamente teor de umidade de 20-65% e pode incluir umectantes tais como propileno glicol, sorbato de potássio e ingredientes que evitam o crescimento microbiano (bactérias e fungos). Ração animal seca possui tipicamente teor de umidade de menos de 20% e seu processamento inclui

normalmente extrusão, secagem e/ou cozimento. Ração animal pode apresentar-se opcionalmente na forma de caldo, iogurte, pó, suspensão, mastigável ou guloseima (por exemplo, biscoitos) e todas essas composições podem também ser utilizadas, se desejado, como suplementos de ração animal. Guloseimas para animais podem ser, por exemplo, guloseimas mastigáveis semiúmidas; guloseimas secas; ossos mastigáveis; guloseimas assadas, extrudadas ou moldadas; ou guloseimas em confeitos. Exemplos de formulações/composições de ração animal nas quais pode ser adicionado um dextrano do presente incluem as descritas nos Pedidos de Patente Norte-Americanos publicados nº 2013/0280352 e 2010/0159103 e na Patente Norte-Americana nº 6.977.084, todos os quais são incorporados ao presente como referência.

[00155] As composições descritas no presente podem apresentar-se na forma de composição de cuidados com tecidos. A composição de cuidados com os tecidos do presente pode ser utilizada para lavagem manual, lavagem em máquina e/ou outros propósitos, tais como, por exemplo, embebedimento e/ou tratamento prévio de tecidos. Composições de cuidados com tecidos podem assumir a forma, por exemplo, de detergente de lavagem, condicionador de tecidos, qualquer produto adicionado na lavagem, enxágue ou secadora, dose unitária ou pulverização. Composições de cuidados com tecidos em forma líquida podem apresentar-se na forma de composição aquosa, conforme descrito no presente. Em outros aspectos, composição de cuidados com tecidos pode apresentar-se em forma seca, tal como detergente granular ou folha amaciante de tecidos adicionada à secadora. Outros exemplos não limitadores de composições de cuidados com tecidos do presente incluem: agentes de lavagem granulares ou em forma de pó, para todos os fins ou de limpeza pesada; agentes de lavagem líquidos, em gel ou em forma de pasta, para todos os fins ou de limpeza pesada; detergentes para tecidos finos (por exemplo, delicados) líquidos



ou secos; auxiliares de limpeza, tais como aditivos alvejantes; “bastões antimanchas”, ou tratamentos prévios; produtos depositados em substratos, tais como chumaços secos e umedecidos, almofadas ou esponjas; pulverizadores e névoas.

[00156] Composições detergentes de acordo com o presente podem apresentar-se em qualquer forma útil, tais como pós, grânulos, pastas, barras, doses unitárias ou líquidos. Detergentes líquidos podem ser aquosos, tipicamente contendo até cerca de 70% em peso de água e 0% em peso a cerca de 30% em peso de solvente orgânico. Eles podem também apresentar-se na forma de tipo de gel compacto contendo apenas cerca de 30% em peso de água.

[00157] Composição detergente compreende tipicamente no presente um ou mais tensoativos, em que o tensoativo é selecionado a partir de tensoativos não iônicos, tensoativos aniônicos, tensoativos catiônicos, tensoativos anfotéricos, tensoativos zwitteriônicos, tensoativos não iônicos semipolares e suas misturas. Em algumas realizações, o tensoativo está presente em nível de cerca de 0,1% a cerca de 60%, enquanto, em realizações alternativas, o nível é de cerca de 1% a cerca de 50%, enquanto, em ainda outras realizações, o nível é de cerca de 5% a cerca de 40% em peso da composição detergente. Detergentes normalmente conterão 0% em peso a cerca de 50% em peso de tensoativos aniônicos, tais como sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS), sulfonato de alfa-olefina (AOS), sulfato de alquila (sulfato de álcool graxo) (AS), etoxissulfato álcool (AEOS ou AES), alcanossulfonatos secundários (SAS), metil ésteres de ácido alfa-sulfo graxo, ácido alquil ou alquenilsuccínico ou sabão. Além disso, composições detergentes podem conter opcionalmente 0% em peso a cerca de 40% em peso de um tensoativo não iônico tal como etoxilato álcool (AEO ou AE), etoxilatos de álcool carboxilado, etoxilato de nonilfenol, alquilpoliglicosídeo, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graxo etoxilado, monoetanolamida de ácido graxo ou amida de ácido graxo póli-

hidróxi alquila (conforme descrito, por exemplo, em WO 92/06154, que é incorporada ao presente como referência).

[00158] Uma composição detergente do presente tipicamente compreende um ou mais construtores ou sistemas construtores de detergente. Um ou mais compostos de póli alfa-1,3-glucano oxidados podem ser incluídos, por exemplo, como construtores. Em alguns aspectos, póli alfa-1,3-glucano oxidado pode ser incluído como coconstrutor, que é utilizado em conjunto com um ou mais construtores adicionais, tais como quaisquer dos descritos no presente. Compostos de póli alfa-1,3-glucano oxidados para uso no presente são descritos no Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2015/0259439. Em algumas realizações que incorporam pelo menos um construtor, as composições de limpeza compreendem pelo menos cerca de 1%, cerca de 3% a cerca de 60% ou até cerca de 5% a cerca de 40% de construtor em peso da composição. Construtores (além de póli alfa-1,3-glucano oxidado) incluem, mas sem limitações, sais de metais alcalinos, amônio e alcanolamônio de polifosfatos, silicatos de metais alcalinos, carbonatos de metais alcalinos e alcalino-terrosos, aluminossilicatos, compostos de policarboxilato, éter hidroxipolicarboxilatos, copolímeros de anidrido maleico com etileno ou vinil metil éter, ácido 1,3,5-trihidroxibenzeno-2,4,6-trissulfônico e ácido carboximetiloxissuccínico, diversos sais de metais alcalinos, amônio e amônio substituído de ácidos poliacéticos, tais como ácido etilenodiamino tetra-acético e ácido nitrilotriacético, bem como policarboxilatos tais como ácido melítico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxidissuccínico, ácido polimaleico, ácido benzeno 1,3,5-tricarboxílico, ácido carboximetiloxissuccínico e seus sais solúveis. Contempla-se, de fato, que qualquer construtor apropriado encontrará uso em várias realizações da presente invenção. Exemplos adicionais de construtor de detergente ou agente de formação de complexo incluem zeólito, difosfato, trifosfato, fosfonato, citrato, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), ácido

dietilenotriaminopenta-acético (DTMPA), ácido alquil ou alquênilsuccínico, silicatos solúveis ou silicatos em camadas (por exemplo, SKS-6 de Hoechst).

[00159] Em algumas realizações, construtores formam complexos de íons de dureza hidrossolúveis (por exemplo, construtores sequestrantes), tais como citratos e polifosfatos (por exemplo, tripolifosfato de sódio e hexa-hidrato tripolifosfato de sódio, tripolifosfato de potássio, tripolifosfato de sódio e de potássio misturados etc.). Contempla-se que qualquer construtor apropriado encontrará uso na presente invenção, incluindo os conhecidos na técnica (vide, por exemplo, EP 2100949).

[00160] Em algumas realizações, aglutinantes apropriados podem incluir construtores de fosfato e construtores não de fosfato. Em algumas realizações, o construtor é um construtor de fosfato. Em algumas realizações, o construtor é um construtor não de fosfato. O construtor pode ser utilizado em nível de 0,1% a 80%, 5% a 60% ou de 10% a 50% em peso da composição. Em algumas realizações, o produto compreende uma mistura de construtores de fosfato e não de fosfato. Construtores de fosfato apropriados incluem monofosfatos, difosfatos, tripolifosfatos ou polifosfatos oligoméricos, incluindo os sais de metais alcalinos desses compostos, incluindo os sais de sódio. Em algumas realizações, o construtor pode ser tripolifosfato de sódio (STPP). Além disso, a composição pode compreender carbonato e/ou citrato, preferencialmente citrato, que ajuda a atingir composição com pH neutro. Outros construtores não de fosfato apropriados incluem homopolímeros e copolímeros de ácidos policarboxílicos e seus sais total ou parcialmente neutralizados, ácidos policarboxílicos monoméricos, ácidos hidroxicarboxílicos e seus sais. Em algumas realizações, os sais dos compostos mencionados acima incluem sais de amônio e/ou metais alcalinos, ou seja, sais de lítio, sódio e potássio, incluindo sais de sódio. Ácidos policarboxílicos apropriados incluem ácidos carboxílicos acíclicos, alicíclicos, heterocíclicos e aromáticos, que, em algumas realizações,

podem conter pelo menos dois grupos carboxila que, em cada caso, são separados entre si, em alguns casos por não mais de dois átomos de carbono.

[00161] A composição detergente do presente pode compreender pelo menos um agente quelante. Agentes quelantes apropriados incluem, mas sem limitações, agentes quelantes de cobre, ferro e/ou manganês e suas misturas. Em realizações nas quais é utilizado pelo menos um agente quelante, a composição compreende cerca de 0,1% a cerca de 15% ou até cerca de 3,0% a cerca de 10% de agente quelante em peso da composição.

[00162] A composição detergente do presente pode compreender pelo menos um auxiliar de deposição. Auxiliares de deposição apropriados incluem, mas sem limitações, polietileno glicol, polipropileno glicol, policarboxilato, polímeros de liberação de sujeira tais como ácido politereftálico, argilas tais como caulinita, montmorilonita, atapulgita, illita, bentonita, haloisita e suas misturas.

[00163] Uma composição detergente do presente pode compreender um ou mais agentes inibidores da transferência de tintura. Agentes inibidores da transferência de tinturas poliméricas incluem, mas sem limitações, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona e N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas e polivinilimidazóis ou suas misturas. Agentes inibidores da transferência de tintura adicionais incluem ftalocianina de manganês, peroxidases, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona e N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas e polivinilimidazóis e/ou suas misturas; agentes quelantes, cujos exemplos incluem ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), ácido dietilenotriaminopentametilenofosfônico (DTPMP), ácido hidroxietanodifosfônico (HEDP), ácido etilenodiamino N,N'-dissuccínico (EDDS); ácido metilglicinodiacético (MGDA), ácido dietilenotriaminopenta-acético (DTPA),

ácido propilenodiaminotetra-acético (PDTA), N-óxido de 2-hidroxipiridina (HPNO) ou ácido metilglicinodiacético (MGDA), ácido glutâmico, ácido N,N-diacético, sal tetrassódico de ácido N,N-dicarboximetilglutâmico (GLDA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido 4,5-di-hidróxi-m-benzenodissulfônico, ácido cítrico e qualquer de seus sais, ácido N-hidroxietililenodiaminotriacético (HEDTA), ácido trietilenotetra-amino-hexa-acético (TTHA), ácido N-hidroxietiliminodiacético (HEIDA), di-hidroxietilglicina (DHEG), ácido etilenodiaminotetrapropiônico (EDTP) e seus derivados, que podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com quaisquer dos acima. Em realizações nas quais é utilizado pelo menos um agente de inibição da transferência de tinturas, a composição do presente pode compreender cerca de 0,0001% a cerca de 10%, cerca de 0,01% a cerca de 5% ou até cerca de 0,1% a cerca de 3% em peso da composição.

[00164] A composição detergente do presente pode compreender silicatos. Em algumas dessas realizações, silicatos de sódio (por exemplo, dissilicato de sódio, metassilicato de sódio e/ou filossilicatos cristalinos) encontram uso. Em algumas realizações, silicatos estão presentes em nível de cerca de 1% a cerca de 20% em peso da composição. Em algumas realizações, silicatos estão presentes em nível de cerca de 5% a cerca de 15% em peso da composição.

[00165] A composição detergente do presente pode compreender dispersantes. Materiais orgânicos hidrossolúveis apropriados incluem, mas sem limitações, os ácidos homo ou copolímeros ou seus sais, em que o ácido policarboxílico compreende pelo menos dois radicais carboxila separados entre si por não mais de dois átomos de carbono.

[00166] A composição detergente do presente pode compreender adicionalmente uma ou mais enzimas. Exemplos de enzimas incluem proteases, celulasas, hemicelulasas, peroxidases, enzimas lipolíticas (por exemplo,

enzimas metalolipolíticas), xilanases, lipases, fosfolipases, esterases (por exemplo, arilesterase, poliesterase), per-hidrolases, cutinases, pectinases, liases de pectato, mananases, queratinases, reductases, oxidases (por exemplo, colino oxidase, fenoloxidase), fenoloxidases, lipoxigenases, ligninases, pululanases, tanases, pentosanases, malanases, beta-glucanases, arabinosidases, hialuronidases, condroitinases, lacases, metaloproteinases, amadoriases, glicoamilases, alfa-amilases, beta-amilases, galactosidases, galactanases, catalases, carragenases, hialuronidases, queratinases, lactases, ligninases, peroxidases, fosfatases, poligalacturonases, pululanases, ramnogalactouronases, tanases, transglutaminases, xiloglucanases, xilosidases, metaloproteases, arabinofuranosidases, fitases, isomerases, transferases e/ou amilases em qualquer combinação.

[00167] Qualquer celulase descrita acima é contemplada para uso nas composições detergentes descritas. Celulases apropriadas incluem, mas sem limitações, celulases de *Humicola insolens* (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 4.435.307). Exemplos de celulases contempladas para uso no presente são as que possuem benefício de cuidado com as cores a tecidos. Exemplos de celulases que fornecem benefício de cuidado com as cores são descritos em EP0495257, EP 0531372, EP 531315, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 94/07998, WO 98/12307, WO 95/24471, WO 98/08940 e Patentes Norte-Americanas nº 5.457.046, 5.686.593 e 5.763.254, todas as quais são incorporadas ao presente como referência. Exemplos de celulases disponíveis comercialmente úteis em detergente incluem CELLUSOFT<sup>®</sup>, CELLUCLEAN<sup>®</sup>, CELLUZYME<sup>®</sup> e CAREZYME<sup>®</sup> (Novo Nordisk A/S e Novozymes A/S); CLAZINASE<sup>®</sup>, PURADAX HA<sup>®</sup> e REVITALENZ<sup>™</sup> (DuPont Industrial Biosciences); BIOTOUCH<sup>®</sup> (AB Enzymes); e KAC-500(B)<sup>®</sup> (Kao Corporation). Celulases adicionais são descritas, por exemplo, em US 7.595.182, US 8.569.033, US 7.138.263, US 3.844.890, US 4.435.307 e GB

2.095.275.

[00168] Em algumas realizações, composições detergentes podem compreender uma ou mais enzimas (por exemplo, qualquer uma das descritas no presente), cada qual em nível de cerca de 0,00001% a cerca de 10% em peso da composição e o saldo de materiais adjuntos de limpeza em peso de composição. Em algumas outras realizações, a composição detergente pode também compreender cada enzima em nível de cerca de 0,0001% a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2% ou cerca de 0,005% a cerca de 0,5% em peso da composição.

[00169] Proteases apropriadas incluem as de origem animal, vegetal ou microbiana. Em algumas realizações, são utilizadas proteases microbianas. Em algumas realizações, são incluídos mutantes química ou geneticamente modificados. Em algumas realizações, a protease é serino protease, preferencialmente protease microbiana alcalina ou protease similar a tripsina. Exemplos de proteases alcalinas incluem subtilisinas, especialmente as derivadas de *Bacillus* (por exemplo, subtilisina, lentus, amyloliquefaciens, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 e subtilisina 168). Exemplos adicionais incluem as proteases mutantes descritas nas Patentes Norte-Americanas nº RE34606, 5.955.340, 5.700.676, 6.312.936 e 6.482.628, todas as quais são incorporadas ao presente como referência. Exemplos de proteases adicionais incluem, mas sem limitações, tripsina (por exemplo, de origem bovina ou suína) e a protease *Fusarium* descrita em WO 89/06270. Em algumas realizações, enzimas de protease disponíveis comercialmente incluem, mas sem limitações, proteases MAXATASE®, MAXACAL®, MAXAPEM®, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAFECT® OXP, PURAMAX®, EXCELLASE®, PREFERENZ® (por exemplo, P100, P110, P280), proteases EFFECTENZ® (por exemplo, P1000, P1050, P2000), proteases EXCELLENZ® (por exemplo, P1000), ULTIMASE® e PURAFAST® (Genencor); ALCALASE®,

SAVINASE®, PRIMASE®, DURAZYM®, POLARZYME®, OVOZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, NEUTRASE®, RELASE® e ESPERASE® (Novozymes); BLAP® e variantes de BLAP® (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Duesseldorf, Alemanha) e KAP (subtilisina de *B. alkalophilus*; Kao Corp., Tóquio, Japão). Várias proteases são descritas e WO 95/23221, WO 92/21760, WO 09/149200, WO 09/149144, WO 09/149145, WO 11/072099, WO 10/056640, WO 10/056653, WO 11/140364, WO 12/151534, Patente Norte-Americana publicada nº 2008/0090747 e Patentes Norte-Americanas nº 5.801.039, 5.340.735, 5.500.364, 5.855.625, RE34606, 5.955.340, 5.700.676, 6.312.936, 6.482.628, 8.530.219 e várias outras patentes. Em algumas realizações adicionais, metaloproteases neutras encontram uso na presente invenção, incluindo, mas sem limitações, as metaloproteases neutras descritas em WO 1999014341, WO 1999033960, WO 1999014342, WO 1999034003, WO 2007044993, WO 2009058303 e WO 2009058661, todas as quais são incorporadas ao presente como referência. Exemplos de metaloproteases incluem nprE, a forma recombinante de metaloprotease neutra expressa em *Bacillus subtilis* (vide, por exemplo, WO 07/044993), e PMN, a metaloprotease neutra purificada de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00170] Manases apropriadas incluem, mas sem limitações, as de origem fúngica ou bacteriana. Mutantes química ou geneticamente modificados são incluídos em algumas realizações. São conhecidas diversas manases que encontram uso na presente invenção (vide, por exemplo, as Patentes Norte-Americanas nº 6.566.114, 6.602.842 e 6.440.991, todas as quais são incorporadas ao presente como referência). Manases disponíveis comercialmente que encontram uso na presente invenção incluem, mas sem limitações, MANNASTAR®, PURABRITE® e MANNAWAY®.

[00171] Lipases apropriadas incluem aquelas de origem fúngica ou bacteriana. Mutantes elaborados com proteínas, proteoliticamente modificados



ou quimicamente modificados são incluídos. Exemplos de lipases úteis incluem aquelas dos gêneros *Humicola* (por exemplo, *H. lanuginosa*, EP 258068 e EP 305216; *H. insolens*, WO 96/13580), *Pseudomonas* (por exemplo, *P. alcaligenes* ou *P. pseudoalcaligenes*, EP 218272; *P. cepacia*, EP 331376; *P. stutzeri*, GB 1372034; *P. fluorescens* e *Pseudomonas* sp., linhagem SD 705, WO 95/06720 e WO 96/27002; *P. wisconsinensis*, WO 96/12012); e *Bacillus* (por exemplo, *B. subtilis*, Dartois et al, *Biochemica et Biophysica Acta* 1131: 253-360; *B. stearothermophilus*, JP 64/744992; *B. pumilus*, WO 91/16422). Além disso, diversas lipases clonadas apresentam uso em algumas realizações da presente invenção, incluindo, mas sem limitações, lipase de *Penicillium camembertii* (vide Yamaguchi et al, *Gene* 103: 61-67 (1991)), lipase de *Geotricum candidum* (vide Schimada et al, *J. Biochem.*, 106: 383-388 (1989)), e várias lipases de *Rhizopus*, tais como lipase de *R. delemar* (vide Hass et al, *Gene* 109: 117-113 (1991)), lipase de *R. niveus* (Kugimiya et al, *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 716-719 (1992)) e lipase de *R. oryzae*. Lipases adicionais úteis no presente incluem, por exemplo, as descritas em WO 92/05249, WO 94/01541, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, EP 407225 e EP 260105. Outros tipos de enzimas de polipeptídeos de lipase, tais como cutinases, também encontram uso em algumas realizações da presente invenção, incluindo, mas sem limitações, cutinase derivada de *Pseudomonas mendocina* (vide WO 88/09367) e cutinase derivada de *Fusarium solani pisi* (vide WO 90/09446). Exemplos de certas enzimas de lipase disponíveis comercialmente úteis no presente incluem M1 LIPASE®, LUMA FAST® e LIPOMAX® (Genencor); LIPEX®, LIPOLASE® e LIPOLASE® ULTRA (Novozymes); e LIPASE P® “Amano” (Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japão).

[00172] Poliesterasas apropriadas incluem, por exemplo, as descritas em WO 01/34899, WO 01/14629 e na Patente Norte-Americana nº

6.933.140.

[00173] Composição detergente no presente pode também compreender 2,6-beta-D-fructano hidrolase, que é eficaz para a remoção e limpeza de certos biofilmes presentes em lavanderia/tecidos domésticos e/ou industriais.

[00174] Amilases apropriadas incluem, mas sem limitações, as de origem fúngica ou bacteriana. Mutantes química ou geneticamente modificados são incluídos em algumas realizações. Amilases que encontram uso na presente invenção incluem, mas sem limitações, alfa-amilases obtidas de *B. licheniformis* (vide, por exemplo, GB 1296839). Amilases apropriadas adicionais incluem as descritas em WO 9510603, WO 9526397, WO 9623874, WO 9623873, WO 9741213, WO 9919467, WO 0060060, WO 0029560, WO 9923211, WO 9946399, WO 0060058, WO 0060059, WO 9942567, WO 0114532, WO 02092797, WO 0166712, WO 0188107, WO 0196537, WO 0210355, WO 9402597, WO 0231124, WO 9943793, WO 9943794, WO 2004113551, WO 2005001064, WO 2005003311, WO 0164852, WO 2006063594, WO 2006066594, WO 2006066596, WO 2006012899, WO 2008092919, WO 2008000825, WO 2005018336, WO 2005066338, WO 2009140504, WO 2005019443, WO 2010091221, WO 2010088447, WO 0134784, WO 2006012902, WO 2006031554, WO 2006136161, WO 2008101894, WO 2010059413, WO 2011098531, WO 2011080352, WO 2011080353, WO 2011080354, WO 2011082425, WO 2011082429, WO 2011076123, WO 2011087836, WO 2011076897, WO 94183314, WO 9535382, WO 9909183, WO 9826078, WO 9902702, WO 9743424, WO 9929876, WO 9100353, WO 9605295, WO 9630481, WO 9710342, WO 2008088493, WO 2009149419, WO 2009061381, WO 2009100102, WO 2010104675, WO 2010117511 e WO 2010115021, todas as quais são incorporadas ao presente como referência.

[00175] Amilases apropriadas incluem, por exemplo, amilases

disponíveis comercialmente tais como STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, NATALASE®, DURAMYL®, TERMAMYL®, TERMAMYL ULTRA®, FUNGAMYL® e BAN® (Novo Nordisk A/S e Novozymes A/S); RAPIDASE®, POWERASE®, PURASTAR® e PREFERENZ® (DuPont Industrial Biosciences).

[00176] Peroxidases/oxidases apropriadas contempladas para uso nas composições incluem as de origem vegetal, bacteriana ou fúngica. Mutantes elaborados de proteínas ou quimicamente modificados são incluídos. Exemplos de peroxidases úteis no presente incluem as do gênero *Coprinus* (por exemplo, *C. cinereus*, WO 93/24618, WO 95/10602 e WO 98/15257), bem como as indicadas em WO 2005056782, WO 2007106293, WO 2008063400, WO 2008106214 e WO 2008106215. Peroxidases disponíveis comercialmente úteis no presente incluem, por exemplo, GUARDZYME® (Novo Nordisk A/S e Novozymes A/S).

[00177] Em algumas realizações, peroxidases são utilizadas em combinação com peróxido de hidrogênio ou sua fonte (por exemplo, percarbonato, perborato ou persulfato) nas composições de acordo com a presente invenção. Em algumas realizações alternativas, oxidases são utilizadas em combinação com oxigênio. Os dois tipos de enzimas são utilizados para “alvejar soluções” (ou seja, para evitar a transferência de uma tintura de tecido de um tecido tingido para outro tecido quando os tecidos são lavados juntos em um líquido de lavagem), preferencialmente em conjunto com um agente de aprimoramento (vide, por exemplo, WO 94/12621 e WO 95/01426). Peroxidases/oxidases apropriadas incluem, mas sem limitações, as de origem vegetal, bacteriana ou fúngica. Mutantes química ou geneticamente modificados são incluídos em algumas realizações.

[00178] Enzimas que podem ser compreendidas em uma composição detergente podem ser estabilizadas utilizando agentes estabilizantes convencionais, tais como poliol como propileno glicol ou glicerol;

açúcar ou álcool de açúcar; ácido láctico; ácido bórico ou derivado de ácido bórico (por exemplo, éster de borato aromático).

[00179] Composições detergentes, em certas realizações, podem compreender um ou mais tipos diferentes de polímeros, além de dextrano conforme descrito no presente. Exemplos de outros tipos de polímeros úteis no presente incluem carboximetil celulose (CMC), póli(vinilpirrolidona) (PVP), polietileno glicol (PEG), álcool (póli)vinílico (PVA), policarboxilatos tais como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico e acrílico e copolímeros de metacrilato de laurila e ácido acrílico.

[00180] Composições detergentes no presente podem conter um sistema alvejante. Sistemas alvejantes podem compreender, por exemplo, uma fonte de  $H_2O_2$  como perborato ou percarbonato, que pode ser combinada com um ativador alvejante formador de perácido, tal como tetra-acetiletilenodiamina (TAED) ou nonanoiloxibenzenossulfonato (NOBS). Alternativamente, o sistema alvejante pode compreender peroxiácidos (por exemplo, peroxiácidos do tipo amida, imida ou sulfona). Ainda alternativamente, sistema alvejante pode ser um sistema alvejante enzimático que compreende per-hidrolase, tal como o sistema descrito em WO 2005/056783.

[00181] Composições detergentes do presente podem também conter ingredientes detergentes convencionais, tais como condicionadores de tecidos, argilas, amplificadores de espuma, supressores de bolhas, agentes anticorrosão, agentes de suspensão de sujeira, agentes antirredeposição de sujeira, tinturas, bactericidas, inibidores de manchas, abrilhantadores ópticos ou perfumes. O pH de uma composição detergente do presente (medido em solução aquosa em concentração de uso) é normalmente neutro ou alcalino (por exemplo, pH de cerca de 7,0 a cerca de 11,0).

[00182] Acredita-se que dextrano do presente possa ser incluído como agente antirredeposição e/ou agente de remoção da sujeira de argila em

composição detergente, tal como composição de cuidados com tecidos, se desejado (esses agentes podem ser opcionalmente caracterizados como agentes de manutenção da claridade, em certos aspectos). Exemplos de outros agentes antirredeposição e/ou de remoção de sujeira de argila apropriados do presente incluem tensoativos zwitteriônicos polietóxi, copolímeros hidrossolúveis de ácido acrílico ou metacrílico com condensados de óxido de etileno e ácido acrílico ou metacrílico (por exemplo, Patente Norte-Americana nº 3.719.647), derivados de celulose tais como carboximetilcelulose e hidroxipropilcelulose (por exemplo, Patentes Norte-Americanas nº 3.597.416 e 3.523.088) e misturas que compreendem tensoativo alquil polietóxi não iônico, tensoativo catiônico quaternário polietóxi alquila e tensoativo de amida graxa (por exemplo, Patente Norte-Americana nº 4.228.044). Exemplos não limitadores de outros agentes de remoção de sujeira de argila e antirredeposição apropriados são descritos nas Patentes Norte-Americanas nº 4.597.898, 4.891.160 e Pedido de Patente Internacional publicado nº WO 95/32272, todos os quais são incorporados ao presente como referência.

[00183] Formas específicas de composições detergentes que podem ser adaptadas para os propósitos descritos no presente são descritas, por exemplo, em US 20090209445A1, US 20100081598A1, US 7001878B2, EP 1504994B1, WO 2001085888A2, WO 2003089562A1, WO 2009098659A1, WO 2009098660A1, WO 2009112992A1, WO 2009124160A1, WO 2009152031A1, WO 2010059483A1, WO 2010088112A1, WO 2010090915A1, WO 2010135238A1, WO 2011094687A1, WO 2011094690A1, WO 2011127102A1, WO 2011163428A1, WO 2008000567A1, WO 2006045391A1, WO 2006007911A1, WO 2012027404A1, EP 1740690B1, WO 2012059336A1, US 6730646B1, WO 2008087426A1, WO 2010116139A1 e WO 2012104613A1, todos os quais são incorporados ao presente como referência.

[00184] Composições detergentes de lavanderia no presente

podem ser opcionalmente composições detergentes de lavanderia de limpeza pesada (todos os fins). Exemplos de composições detergentes de lavanderia de limpeza pesada compreendem um tensoativo detergente (10%-40% peso/peso), incluindo um tensoativo detergente aniônico (selecionado a partir de um grupo de sulfatos de alquila, sulfonatos de alquila, sulfato de alquila alcoxilado, fosfatos de alquila, fosfonatos de alquila, carboxilatos de alquila lineares, ramificados ou de cadeia aleatória, substituídos ou não substituídos e/ou suas misturas) e, opcionalmente, tensoativos não iônicos (selecionados a partir de um grupo de álcoois alquil alcoxilados substituídos ou não substituídos, de cadeia linear, ramificada ou aleatória, tais como álcoois etoxilados alquila C8-C18 e/ou alcoxilatos de alquil fenol C6-C12), em que a razão em peso entre tensoativo detergente aniônico (com índice hidrofílico (HLC) de 6,0 a 9) e tensoativo detergente não iônico é de mais de 1:1. Tensoativos detergentes apropriados também incluem tensoativos detergentes catiônicos (selecionados a partir de um grupo de compostos de alquil piridínio, compostos de amônio alquila quaternários, compostos de fosfônio alquila quaternários, compostos de sulfônio alquila ternários e/ou suas misturas); tensoativos detergentes zwitteriônicos e/ou anfotéricos (selecionados a partir de um grupo de alcanolamino sulfobetaínas); tensoativos anfóliticos; tensoativos não iônicos semipolares e suas misturas.

[00185] Detergente no presente, tal como uma composição detergente de lavanderia de trabalho pesado pode opcionalmente incluir um polímero amplificador da detergência que consiste de polímeros de limpeza graxos alcoxilados anfifílicos (selecionados a partir de um grupo de polímeros alcoxilados que possuem propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas ramificadas, tais como polialquilenoininas alcoxiladas na faixa de 0,05% em peso a 10% em peso) e/ou polímeros de enxerto aleatórios (que tipicamente compreendem monômeros que compreendem cadeia principal hidrofílica selecionados a partir do grupo que consiste de: ácidos carboxílicos C1-C6 insaturados, éteres, álcoois,

aldeídos, cetonas, ésteres, unidades de açúcar, unidades alcóxi, anidrido maleico, poliálcoois saturados tais como glicerol e suas misturas; e cadeia(s) lateral(is) hidrofóbica(s) selecionada(s) a partir do grupo que consiste de: grupo alquila C4-C25, polipropileno, polibutileno, vinil éster de um ácido monocarboxílico C1-C6 saturado, alquil C1-C6 éster de ácido acrílico ou metacrílico e suas misturas.

[00186] Detergente no presente, tal como uma composição detergente de lavanderia de limpeza pesada, pode incluir opcionalmente polímeros adicionais tais como polímeros de liberação de sujeira (incluindo poliésteres anionicamente tampados, tais como SRP1, polímeros que compreendem pelo menos uma unidade monomérica selecionada a partir de sacarídeo, ácido dicarboxílico, poliol e suas combinações, em configuração de bloco ou aleatória, polímeros com base em tereftalato de etileno e seus copolímeros em configuração de bloco ou aleatória, tal como REPEL-O-TEX SF, SF-2 e SRP6, TEXCARE SRA100, SRA300, SRN100, SRN170, SRN240, SRN300 e SRN325, MARLOQUEST SL), agente(s) antirredeposição do presente (0,1% em peso a 10% em peso), incluem polímeros de carboxilato, tais como polímeros que compreendem pelo menos um monômero selecionado a partir de ácido acrílico, ácido maleico (ou anidrido maleico), ácido fumárico, ácido itacônico, ácido aconítico, ácido mesacônico, ácido citracônico, ácido metilenomalônico e quaisquer de suas misturas, homopolímero de vinilpirrolidona e/ou polietileno glicol, peso molecular na faixa de 500 a 100.000 Da); e carboxilato polimérico (tal como copolímero aleatório de maleato e acrilato ou homopolímero de poliacrilato).

[00187] Detergente no presente, tal como uma composição detergente de lavanderia de trabalho pesado, pode opcionalmente incluir, adicionalmente, ácidos graxos saturados ou insaturados, preferencialmente ácidos graxos C12-C24 saturados ou insaturados (0% em peso a 10% em peso);

auxiliares de disposição, além de um composto de dextrano descrito no presente (cujos exemplos incluem polissacarídeos, polímeros celulósicos, haletos de póli dialil dimetil amônio (DADMAC) e copolímeros de DAD MAC com vinil pirrolidona, acrilamidas, imidazóis, haletos de imidazólio e suas misturas, em configuração de bloco ou aleatórias, goma guar catiônica, amido catiônico, poliacilamidas catiônicas e suas misturas.

[00188] Detergente no presente, tal como composição detergente de lavanderia de limpeza pesada, pode opcionalmente incluir, adicionalmente, agentes inibidores da transferência de tintura, cujos exemplos incluem ftalocianina de manganês, peroxidases, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona e N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas e polivinilimidazóis e/ou suas misturas; agentes quelantes, cujos exemplos incluem ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), ácido dietilenotriaminopentametileno-fosfônico (DTPMP), ácido hidroxietanodifosfônico (HEDP), ácido etilenodiamino N,N'-dissuccínico (EDDS); ácido metilglicinodiacético (MGDA), ácido dietilenotriaminopenta-acético (DTPA), ácido propilenodiaminotetra-acético (PDTA), N-óxido de 2-hidroxipiridina (HPNO) ou ácido metilglicinodiacético (MGDA), ácido glutâmico, ácido N,N-diacético, sal tetrassódico de ácido N,N-dicarboximetilglutâmico (GLDA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido 4,5-di-hidróxi-m-benzenodissulfônico, ácido cítrico e qualquer de seus sais, ácido N-hidroxietilenodiaminotriacético (HEDTA), ácido trietenotetra-amino-hexa-acético (TTHA), ácido N-hidroxietiliminodiacético (HEIDA), di-hidroxietilglicina (DHEG), ácido etilenodiaminotetrapropiônico (EDTP) e seus derivados.

[00189] Detergente no presente, tal como uma composição detergente de lavanderia de limpeza pesada, pode incluir opcionalmente supressores de bolhas com base em ácido graxo ou silicone; tinturas de matizes, cátions de cálcio e magnésio, ingredientes de sinalização visual, antiespumantes



(0,001% em peso a cerca de 4,0% em peso) e/ou estruturante/espessante (0,01% em peso a 5% em peso) selecionado a partir do grupo que consiste de diglicérides e triglicérides, diestearato de etileno glicol, celulose microcristalina, celulose de microfibras, biopolímeros, goma xantana, goma gelana e suas misturas). Esse estruturante/espessante seria, em certas realizações, adicional a um ou mais compostos de dextrano compreendidos no detergente. O estruturador pode também ser denominado agente estrutural.

[00190] Detergente no presente pode apresentar-se, por exemplo, na forma de composição detergente de lavanderia sólida/seca de limpeza pesada. Esse detergente pode incluir: (i) tensoativo detergente, tal como qualquer tensoativo detergente aniônico descrito no presente, qualquer tensoativo detergente não iônico descrito no presente, qualquer tensoativo detergente catiônico descrito no presente, qualquer tensoativo detergente zwitteriônico e/ou anfotérico descrito no presente, qualquer tensoativo anfólico, qualquer tensoativo não iônico semipolar e suas misturas; (ii) construtor, tal como qualquer construtor livre de fosfato (por exemplo, construtores de zeólitos na faixa de 0% em peso a menos de 10% em peso), qualquer construtor de fosfato (por exemplo, tripolifosfato de sódio na faixa de 0% em peso a menos de 10% em peso), ácido cítrico, sais de citrato e ácido nitrilotriacético, qualquer sal de silicato (por exemplo, silicato de sódio ou potássio ou metassilicato de sódio na faixa de 0% em peso a menos de 10% em peso); qualquer sal de carbonato (por exemplo, carbonato de sódio e/ou bicarbonato de sódio na faixa de 0% em peso a menos de 80% em peso) e suas misturas; (iii) agente alvejante, tal como qualquer fotoalvejante (por exemplo, ftalocianinas de zinco sulfonatadas, ftalocianinas de alumínio sulfonatadas, tinturas de xanteno e suas misturas), qualquer ativador alvejante hidrofóbico ou hidrofílico (por exemplo, oxibenzeno sulfonato de decanoíla, oxibenzeno sulfonato de decanoíla, ácido decanoil oxibenzoico ou seus sais, oxibenzeno sulfonato de 3,5,5-trimetil hexanoíla, tetra-

acetil etileno diamina-TAED, nonanoiloxibenzeno sulfonato-NOBS, quaternários de nitrila e suas misturas), qualquer fonte de peróxido de hidrogênio (por exemplo, sais de per-hidrato inorgânico, cujos exemplos incluem sal de sódio mono ou tetra-hidrato de perborato, percarbonato, persulfato, perfosfato ou persilicato), quaisquer perácidos hidrofóbicos e/ou hidrofílicos previamente formados (por exemplo, ácidos percarboxílicos e seus sais, ácidos percarbônicos e seus sais, ácidos perimídicos e seus sais, ácidos peroximonossulfúricos e seus sais, bem como suas misturas); e/ou (iv) quaisquer outros componentes, tais como catalisador alvejante (por exemplo, exemplos de amplificadores alvejantes de imina que incluem póli-íons e cátions de imínio, zwitteríons de imínio, aminas modificadas, óxidos de amina modificados, N-sulfonil iminas, N-fosfonil iminas, N-acil iminas, dióxidos de tiadiazol, perfluoroiminas, cetonas de açúcar cíclicas e suas misturas) e um catalisador alvejante que contém metal (por exemplo, cátions de cobre, ferro, titânio, rutênio, tungstênio, molibdênio ou manganês, em conjunto com cátions metálicos auxiliares, tais como zinco ou alumínio, e um sequestrado, tal como EDTA, ácido (etilenodiaminotetra)metilenofosfônico.

[00191] As composições descritas no presente podem apresentar-se, por exemplo, na forma de composição detergente de lavagem de pratos. Exemplos de detergentes de lavagem de pratos incluem detergentes de lavagem de pratos automáticos (tipicamente utilizados em máquinas lavadoras de pratos) e detergentes para lavagem manual de pratos. Composições detergentes de lavagem de pratos podem apresentar-se, por exemplo, em qualquer forma seca ou líquida/aquosa conforme descrito no presente. Os componentes que podem ser incluídos em certas realizações de uma composição detergente de lavagem de pratos incluem, por exemplo, um ou mais dentre um fosfato; agente alvejante com base em oxigênio ou cloro; tensoativo não iônico; sal alcalino (tal como metassilicatos, hidróxidos de metais alcalinos e carbonato de sódio); qualquer enzima ativa descrita no presente; agente anticorrosão (por exemplo, silicato de

sódio); agente antiespumante; aditivos para reduzir a velocidade de remoção de esmalte e padrões de cerâmicas; perfume; agente antiaglomerante (em detergente granular); amido (em detergentes em pastilhas); agente gelificante (em detergentes em gel/líquidos); e/ou areia (detergentes em pó).

[00192] Detergentes de lavagem de pratos, tais como detergente de lavadora de pratos automática ou detergentes de lavagem de pratos líquidos podem compreender (i) um tensoativo não iônico, incluindo qualquer tensoativo não iônico etoxilado, tensoativo alcoxilado de álcool, álcool (póli)oxialquilado tampado com epóxi ou tensoativo de óxido de amina presente em quantidade de 0 a 10% em peso; (ii) construtor, na faixa de cerca de 5-60% em peso, incluindo qualquer construtor de fosfato (por exemplo, monofosfatos, difosfatos, tripolifosfatos, outros polifosfatos oligoméricos, tripolifosfato de sódio (STPP)), qualquer construtor livre de fosfato (por exemplo, compostos com base em aminoácidos, incluindo ácido metilglicinodiacético (MGDA) e seus sais ou derivados, ácido glutâmico-N,N-diacético (GLDA) e seus sais ou derivados, ácido iminodissuccínico (IDS) e seus sais ou derivados, carbóxi metil inulina e seus sais ou derivados, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido dietileno triamino penta acético (DTPA), ácido B-alaninodiacético (B-ADA) e seus sais), homopolímeros e copolímeros de ácidos policarboxílicos e seus sais total ou parcialmente neutralizados, ácidos policarboxílicos monoméricos e ácidos hidroxicarboxílicos e seus sais na faixa de 0,5% em peso a 50% em peso ou polímeros sulfonatados/carboxilados na faixa de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso; (iii) auxiliar de secagem na faixa de cerca de 0,1% em peso a cerca de 10% em peso (por exemplo, poliésteres, especialmente poliésteres aniônicos, opcionalmente em conjunto com monômeros adicionais com três a seis funcionalidades - tipicamente funcionalidades ácidas, álcool ou éster, que levam à policondensação, compostos de policarbonato, poliuretano e/ou poliureia-poliorganossiloxano ou seus compostos precursores, particularmente

do tipo ureia e carbonato cíclico reativo); (iv) silicato na faixa de cerca de 1% em peso a cerca de 20% em peso (por exemplo, silicatos de sódio ou potássio, tais como dissilicato dissódico, metassilicato de sódio e filossilicatos cristalinos); (v) alvejante inorgânico (por exemplo, sais de per-hidrato, tais como sais de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato e persilicato) e/ou alvejante orgânico (por exemplo, peroxiácidos orgânicos, tais como peróxidos de diacila e tetra-acila, especialmente ácido diperoxidodecanodioico, ácido diperoxitetradecanodioico e ácido diperóxi-hexadecanodioico); (vi) ativador alvejante (por exemplo, precursores de perácido orgânico na faixa de cerca de 0,1% em peso a cerca de 10% em peso) e/ou catalisador alvejante (por exemplo, manganês triazaciclonoano e complexos relacionados; Co, Cu, Mn e Fe bispíridilamina e complexos relacionados; e acetato de pentamina cobalto (III) e complexos relacionados); (vii) um agente de cuidados metálicos na faixa de cerca de 0,1% em peso a 5% em peso (por exemplo, benzotriazóis, complexos e sais metálicos e/ou silicatos); e/ou (viii) qualquer enzima ativa descrita no presente na faixa de cerca de 0,01 a 5,0 mg de enzima ativa por grama de composição detergente de lavagem de pratos automática e um componente estabilizante de enzimas (por exemplo, oligossacarídeos, polissacarídeos e sais metálicos bivalentes inorgânicos).

[00193] Vários exemplos de formulações detergentes que compreendem pelo menos um dextrano no presente são descritos abaixo (1-19):

1. Composição detergente formulada como granulado, que possui densidade a granel de pelo menos 600 g/l e compreende: sulfonato de alquilbenzeno linear (calculado na forma de ácido) a cerca de 7-12% em peso; etoxissulfato álcool (por exemplo, álcool C12-18, óxido de etileno 1-2 (EO)) ou sulfato de alquila (por exemplo, C16-18) a cerca de 1-4% em peso; etoxilato álcool (por exemplo, álcool C14-15) a cerca de 5-9% em peso; carbonato de sódio a cerca de 14-20% em peso; silicato solúvel (por exemplo,  $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{SiO}_2$ ) a

cerca de 2-6% em peso; zeólito (por exemplo,  $\text{NaAlSiO}_4$ ) a cerca de 15-22% em peso; sulfato de sódio a cerca de 0-6% em peso; citrato de sódio/ácido cítrico a cerca de 0-15% em peso; perborato de sódio a cerca de 11-18% em peso; TAED a cerca de 2-6% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; outros polímeros (por exemplo, copolímero de ácido acrílico/maleico, PVP, PEG) a cerca de 0-3% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, supressores de bolhas, perfumes, abrillantador óptico e fotoalvejante) a cerca de 0-5% em peso.

2. Composição detergente formulada como granulado, que possui densidade a granel de pelo menos 600 g/l e compreende: sulfonato de alquilbenzeno linear (calculado na forma de ácido) a cerca de 6-11% em peso; etoxissulfato álcool (por exemplo, álcool C12-18, EO 1-2) ou sulfato de alquila (por exemplo, C16-18) a cerca de 1-3% em peso; etoxilato álcool (por exemplo, álcool C14-15) a cerca de 5-9% em peso; carbonato de sódio a cerca de 15-21% em peso; silicato solúvel (por exemplo,  $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{SiO}_2$ ) a cerca de 1-4% em peso; zeólito (por exemplo,  $\text{NaAlSiO}_4$ ) a cerca de 24-34% em peso; sulfato de sódio a cerca de 4-10% em peso; citrato de sódio/ácido cítrico a cerca de 0-15% em peso; perborato de sódio a cerca de 11-18% em peso; TAED a cerca de 2-6% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; outros polímeros (por exemplo, copolímero de ácido acrílico/maleico, PVP, PEG) a cerca de 1-6% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, supressores de bolhas, perfumes, abrillantador óptico e fotoalvejante) a cerca de 0-5% em peso.

3. Composição detergente formulada como granulado, que possui densidade a granel de pelo menos 600 g/l e compreende: sulfonato de alquilbenzeno linear (calculado na forma de ácido) a cerca de 5-9% em peso;

etoxissulfato álcool (por exemplo, álcool C12-18, 7 EO) a cerca de 7-14% em peso; sabão como ácido graxo (por exemplo, ácido graxo C16-22) a cerca de 1-3% em peso; carbonato de sódio a cerca de 10-17% em peso; silicato solúvel (por exemplo,  $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{SiO}_2$ ) a cerca de 3-9% em peso; zeólito (por exemplo,  $\text{NaAlSiO}_4$ ) a cerca de 23-33% em peso; sulfato de sódio a cerca de 0-4% em peso; perborato de sódio a cerca de 8-16% em peso; TAED a cerca de 2-8% em peso; fosfonato (por exemplo, EDTMPA) a cerca de 0-1% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; outros polímeros (por exemplo, copolímero de ácido acrílico/maleico, PVP, PEG) a cerca de 0-3% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, supressores de bolhas, perfumes, abrilhantador óptico) a cerca de 0-5% em peso.

4. Composição detergente formulada como granulado, que possui densidade a granel de pelo menos 600 g/l e compreende: sulfonato de alquilbenzeno linear (calculado na forma de ácido) a cerca de 8-12% em peso; etoxilato álcool (por exemplo, álcool C12-18, 7 EO) a cerca de 10-25% em peso; carbonato de sódio a cerca de 14-22% em peso; silicato solúvel (por exemplo,  $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{SiO}_2$ ) a cerca de 1-5% em peso; zeólito (por exemplo,  $\text{NaAlSiO}_4$ ) a cerca de 25-35% em peso; sulfato de sódio a cerca de 0-10% em peso; perborato de sódio a cerca de 8-16% em peso; TAED a cerca de 2-8% em peso; fosfonato (por exemplo, EDTMPA) a cerca de 0-1% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; outros polímeros (por exemplo, copolímero de ácido acrílico/maleico, PVP, PEG) a cerca de 1-3% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, supressores de bolhas, perfumes) a cerca de 0-5% em peso.

5. Composição detergente líquida aquosa, que compreende: sulfonato de alquilbenzeno linear (calculado na forma de ácido) a cerca de 15-

21% em peso; etoxilato álcool (por exemplo, álcool C12-18, 7 EO; ou álcool C12-15, 5 EO) a cerca de 12-18% em peso; sabão como ácido graxo (por exemplo, ácido oleico) a cerca de 3-13% em peso; ácido alquenilsuccínico (C12-14) a cerca de 0-13% em peso; aminoetanol a cerca de 8-18% em peso; ácido cítrico a cerca de 2-8% em peso; fosfonato a cerca de 0-3% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; outros polímeros (por exemplo, PVP, PEG) a cerca de 0-3% em peso; borato a cerca de 0-2% em peso; etanol a cerca de 0-3% em peso; propileno glicol a cerca de 8-14% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, dispersantes, supressores de bolhas, perfume e abrilhantador óptico) a cerca de 0-5% em peso.

6. Composição detergente líquida estruturada aquosa, que compreende: sulfonato de alquilbenzeno linear (calculado na forma de ácido) a cerca de 15-21% em peso; etoxilato álcool (por exemplo, álcool C12-18, 7 EO; ou álcool C12-15, 5 EO) a cerca de 3-9% em peso; sabão como ácido graxo (por exemplo, ácido oleico) a cerca de 3-10% em peso; zeólito (por exemplo,  $\text{NaAlSiO}_4$ ) a cerca de 14-22% em peso; citrato de potássio a cerca de 9-18% em peso; borato a cerca de 0-2% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; outros polímeros (por exemplo, PVP, PEG) a cerca de 0-3% em peso; etanol a cerca de 0-3% em peso; polímeros âncora (por exemplo, copolímero de metacrilato de laurila e ácido acrílico, razão molar 25:1, peso molecular de 3800) a cerca de 0-3% em peso; glicerol a cerca de 0-5% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, dispersantes, supressores de bolhas, perfume e abrilhantador óptico) a cerca de 0-5% em peso.

7. Composição detergente formulada como granulado, que

possui densidade a granel de pelo menos 600 g/l e compreende: sulfato de álcool graxo a cerca de 5-10% em peso, monoetanolamida de ácido graxo etoxilada a cerca de 3-9% em peso; sabão como ácido graxo a cerca de 0-3% em peso; carbonato de sódio a cerca de 5-10% em peso; silicato solúvel (por exemplo,  $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{SiO}_2$ ) a cerca de 1-4% em peso; zeólito (por exemplo,  $\text{NaAlSiO}_4$ ) a cerca de 20-40% em peso; sulfato de sódio a cerca de 2-8% em peso; perborato de sódio a cerca de 12-18% em peso; TAED a cerca de 2-7% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; outros polímeros (por exemplo, copolímero de ácido acrílico/maleico, PEG) a cerca de 1-5% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, abrillantador óptico, supressores de bolhas, perfumes) a cerca de 0-5% em peso.

8. Composição detergente formulada como granulado, que compreende: sulfonato de alquilbenzeno linear (calculado na forma de ácido) a cerca de 8-14% em peso, monoetanolamida de ácido graxo etoxilada a cerca de 5-11% em peso; sabão como ácido graxo a cerca de 0-3% em peso; carbonato de sódio a cerca de 4-10% em peso; silicato solúvel (por exemplo,  $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{SiO}_2$ ) a cerca de 1-4% em peso; zeólito (por exemplo,  $\text{NaAlSiO}_4$ ) a cerca de 30-50% em peso; sulfato de sódio a cerca de 3-11% em peso; citrato de sódio a cerca de 5-12% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; outros polímeros (por exemplo, PVP, copolímero de ácido acrílico/maleico, PEG) a cerca de 1-5% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, supressores de bolhas e perfumes) a cerca de 0-5% em peso.

9. Composição detergente formulada como granulado, que compreende: sulfato de alquilbenzeno linear (calculado na forma de ácido) a cerca de 6-12% em peso; tensoativo não iônico a cerca de 1-4% em peso; sabão



como ácido graxo a cerca de 2-6% em peso; carbonato de sódio a cerca de 14-22% em peso; zeólito (por exemplo,  $\text{NaAlSiO}_4$ ) a cerca de 18-32% em peso; sulfato de sódio a cerca de 5-20% em peso; citrato de sódio a cerca de 3-8% em peso; perborato de sódio a cerca de 4-9% em peso; ativador de alvejante (por exemplo, NOBS ou TAED) a cerca de 1-5% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; outros polímeros (por exemplo, policarboxilato ou PEG) a cerca de 1-5% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, abrillantadores ópticos e perfume) a cerca de 0-5% em peso.

10. Composição detergente líquida aquosa, que compreende: sulfonato de alquilbenzeno linear (calculado na forma de ácido) a cerca de 15-23% em peso; etoxissulfato álcool (por exemplo, álcool C12-15, 2-3 EO) a cerca de 8-15% em peso; etoxilato álcool (por exemplo, álcool C12-15, 7 EO; ou álcool C12-15, 5 EO) a cerca de 3-9% em peso; sabão como ácido graxo (por exemplo, ácido láurico) a cerca de 0-3% em peso; aminoetanol a cerca de 1-5% em peso; citrato de sódio a cerca de 5-10% em peso; hidrotropo (por exemplo, toluenossulfonato de sódio) a cerca de 2-6% em peso; borato a cerca de 0-2% em peso; dextrano no presente até cerca de 1% em peso; etanol a cerca de 1-3% em peso; propileno glicol a cerca de 2-5% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, dispersantes, perfume e abrillantadores ópticos) a cerca de 0-5% em peso.

11. Composição detergente líquida aquosa, que compreende: sulfonato de alquilbenzeno linear (calculado na forma de ácido) a cerca de 20-32% em peso; etoxilato álcool (por exemplo, álcool C12-15, 7 EO; ou álcool C12-15, 5 EO) a cerca de 6-12% em peso; aminoetanol a cerca de 2-6% em peso; ácido cítrico a cerca de 8-14% em peso; borato a cerca de 1-3% em peso;

dextrano no presente até cerca de 2% em peso; etanol a cerca de 1-3% em peso; propileno glicol a cerca de 2-5% em peso; outros polímeros (por exemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, polímero âncora tal como copolímero de metacrilato de laurila e ácido acrílico) a cerca de 0-3% em peso; glicerol a cerca de 3-8% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, hidrotropos, dispersantes, perfume e abrillantadores ópticos) a cerca de 0-5% em peso.

12. Composição detergente formulada como granulado, que possui densidade a granel de pelo menos 600 g/l e compreende: tensoativo aniônico (por exemplo, sulfonato de alquilbenzeno linear, sulfato de alquila, sulfonato de alfa-olefina, metil ésteres de ácidos graxos alfa-sulfo, alcanossulfonatos e sabão) a cerca de 25-40% em peso; tensoativo não iônico (por exemplo, etoxilato álcool) a cerca de 1-10% em peso; carbonato de sódio a cerca de 8-25% em peso; silicato solúvel (por exemplo,  $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{SiO}_2$ ) a cerca de 5-15% em peso; sulfato de sódio a cerca de 0-5% em peso; zeólito ( $\text{NaAlSiO}_4$ ) a cerca de 15-28% em peso; perborato de sódio a cerca de 0-20% em peso; ativador alvejante (por exemplo, TAED ou NOBS) a cerca de 0-5% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, perfume e abrillantadores ópticos) a cerca de 0-3% em peso.

13. Composições detergentes de acordo com 1 a 12 acima, nas quais, no todo ou em parte, o sulfonato de alquilbenzeno linear é substituído por sulfato de alquila C12-C18.

14. Composição detergente formulada como granulado, que possui densidade a granel de pelo menos 600 g/l e compreende: sulfato de alquila C12-C18 a cerca de 9-15% em peso; etoxilato álcool a cerca de 3-6% em

peso; amida de ácido graxo póli-hidróxi alquila a cerca de 1-5% em peso; zeólito (por exemplo, NaAlSiO<sub>4</sub>) a cerca de 10-20% em peso; dissilicato em camadas (por exemplo, SK56 da Hoechst) a cerca de 10-20% em peso; carbonato de sódio a cerca de 3-12% em peso; silicato solúvel (por exemplo, Na<sub>2</sub>O 2SiO<sub>2</sub>) a 0-6% em peso; citrato de sódio a cerca de 4-8% em peso; percarbonato de sódio a cerca de 13-22% em peso; TAED a cerca de 3-8% em peso; dextrano no presente até cerca de 2% em peso; outros polímeros (por exemplo, policarboxilatos e PVP) a cerca de 0-5% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, abrilhantador óptico, fotoalvejante, perfume e supressores de bolhas) a cerca de 0-5% em peso.

15. Composição detergente formulada como granulado, que possui densidade a granel de pelo menos 600 g/l e compreende: sulfato de alquila C12-C18 a cerca de 4-8% em peso; etoxilato álcool a cerca de 11-15% em peso; sabão a cerca de 1-4% em peso; zeólito MAP ou zeólito A a cerca de 35-45% em peso; carbonato de sódio a cerca de 2-8% em peso; silicato solúvel (por exemplo, Na<sub>2</sub>O 2SiO<sub>2</sub>) a 0-4% em peso; percarbonato de sódio a cerca de 13-22% em peso; TAED a cerca de 1-8% em peso; dextrano no presente até cerca de 3% em peso; outros polímeros (por exemplo, policarboxilatos e PVP) a cerca de 0-3% em peso; opcionalmente, uma ou mais enzimas (calculadas na forma de proteína de enzima pura) a cerca de 0,0001-0,1% em peso; e ingredientes menores (por exemplo, abrilhantador óptico, fosfonato e perfume) a cerca de 0-3% em peso.

16. Formulações detergentes de acordo com 1 a 15 acima, que contêm perácido estabilizado ou encapsulado, seja na forma de componente adicional ou como substituto para um ou mais sistemas alvejantes já especificados.

17. Composições detergentes de acordo com 1, 3, 7, 9 ou 12

acima, em que perborato é substituído por percarbonato.

18. Composições detergentes de acordo com 1, 3, 7, 9, 12, 14 ou 15 acima, que contêm adicionalmente um catalisador de manganês. Catalisador de manganês, por exemplo, é um dos compostos descritos por Hage et al (1994, *Nature* 369: 637-639), que é incorporado ao presente como referência.

19. Composições detergentes formuladas na forma de líquido detergente não aquoso que compreende um tensoativo não iônico líquido (por exemplo, álcool primário alcoilado linear), sistema construtor (por exemplo, fosfato), dextrano no presente, opcionalmente uma ou mais enzimas e álcali. O detergente pode também compreender um tensoativo aniônico e/ou sistema alvejante.

[00194] Acredita-se que numerosas formulações detergentes disponíveis comercialmente possam ser adaptadas para incluir um composto de dextrano descrito no presente. Exemplos incluem PUREX® ULTRAPACKS (Henkel), FINISH® QUANTUM (Reckitt Benckiser), CLOROX® 2 PACKS (Clorox), OXICLEAN MAX FORCE POWER PAKS (Church & Dwight), TIDE® STAIN RELEASE, CASCADE® ACTIONPACS e TIDE® PODS® (Procter & Gamble).

[00195] As composições descritas no presente podem apresentar-se, por exemplo, na forma de composição de cuidados orais. Exemplos de composições de cuidados orais incluem dentifrícios, cremes dentais, lavagem bucal, enxágue bucal, goma de mascar e fitas comestíveis que fornecem algum tipo de cuidado oral (por exemplo, tratamento ou prevenção de cavidades (cáries dentais), gengivite, placa, tártaro e/ou doenças periodontais). Composições de cuidados orais podem também destinar-se ao tratamento de “superfície oral”, que engloba qualquer superfície mole ou dura dentro da cavidade oral, incluindo superfícies da língua, palato duro e mole, mucosa bucal, gengiva e superfícies dentais. “Superfície dental” no presente é, por exemplo, uma superfície de dente

natural ou superfície dura de dentição artificial, incluindo coroa, tampa, enchimento, ponte, dentadura ou implante dental.

[00196] Composições de cuidados orais no presente podem compreender, por exemplo, cerca de 0,01-15,0% em peso (por exemplo, cerca de 0,1-10% em peso, cerca de 0,1-5,0% em peso ou cerca de 0,1-2,0% em peso) de um ou mais compostos éter de dextrano conforme descrito no presente. Um ou mais compostos de éter de dextrano compreendidos em uma composição de cuidados orais podem às vezes ser fornecidos na forma de agente espessante e/ou agente de dispersão, que podem ser úteis para impor sensação na boca e/ou consistência desejada à composição. Um ou mais agentes de dispersão ou espessantes podem também ser fornecidos, por exemplo, em uma composição de cuidados orais do presente, tal como polímero de carboxivinila, carrageno (por exemplo, L-carrageno), goma natural (por exemplo, caraia, xantana, goma arábica e tragacanto), silicato de alumínio e magnésio coloidal ou sílica coloidal.

[00197] A composição de cuidados orais de acordo com o presente pode ser, por exemplo, creme dental ou outro dentífrico. Essas composições, bem como qualquer outra composição de cuidados orais do presente, podem compreender adicionalmente, sem limitações, um ou mais dentre agente anticáries, agente antimicrobiano ou antibactericida, agente anticálcio ou de controle do tártaro, tensoativo, abrasivo, agente modificador do pH, modulador da espuma, umectante, aromatizante, adoçante, pigmento/corante, agente branqueador e/ou outros componentes apropriados. Exemplos de composições de cuidados orais às quais um ou mais compostos de dextrano podem ser adicionados são descritos nos Pedidos de Patente Norte-Americanos publicados nº 2006/0134025, 2002/0022006 e 2008/0057007, que são incorporados ao presente como referência.

[00198] Agente anticáries no presente pode ser uma fonte oralmente aceitável de íons de fluoreto. Fontes apropriadas de íons de fluoreto

incluem sais de fluoreto, monofluorofosfato e fluorossilicato, bem como fluoretos de amina, incluindo, por exemplo, olaflur (N'-octadeciltrimetilenodiamina-N,N,N'-tris(2-etanol)-difluoridreto). Agentes anticáries podem estar presentes, por exemplo, em quantidade que fornece, ao todo, cerca de 100-20000 ppm, cerca de 200-5000 ppm ou cerca de 500-2500 ppm de íons de fluoreto à composição. Em composições de cuidados orais nas quais fluoreto de sódio é a única fonte de íons de fluoreto, pode estar presente na composição, por exemplo, quantidade de cerca de 0,01-5,0% em peso, cerca de 0,05-1,0% em peso ou cerca de 0,1-0,5% em peso de fluoreto de sódio.

[00199] Agente antimicrobiano ou antibacteriano apropriado para uso em composições de cuidados orais inclui, por exemplo, compostos fenólicos (por exemplo, 4-alilcatecol; ésteres de ácidos p-hidroxibenzoicos tais como benzilparaben, butilparaben, etilparaben, metilparaben e propilparaben; 2-benzilfenol; hidroxianisol butilado; hidroxitolueno butilado; capsaicina; carvacrol; creosol; eugenol; guaiacol; bisfenólicos halogenados, tais como hexaclorofeno e bromoclorofeno; 4-hexilresorcinol; 8-hidroxiquinolina e seus sais; ésteres de ácido salicílico, tais como salicilato de mentila, salicilato de metila e salicilato de fenila; fenol; pirocatecol; salicilanilida; timol; compostos de difeniléter halogenados, tais como triclosan e monofosfato de triclosan), compostos de cobre (II) (por exemplo, cloreto, fluoreto, sulfato e hidróxido de cobre (II)), fontes de íons de zinco (por exemplo, acetato, citrato, gluconato, glicinato, óxido e sulfato de zinco), ácido ftálico e seus sais (por exemplo, ftalato de monopotássio e magnésio), hexetidina, octenidina, sanguinarina, cloreto de benzalcônio, brometo de domifeno, cloretos de alquilpiridínio (por exemplo, cloreto de cetilpiridínio, cloreto de tetradecilpiridínio, cloreto de N-tetradecil-4-etilpiridínio), iodo, sulfonamidas, bisbiguanidas (por exemplo, alexidina, clor-hexidina, digluconato de clor-hexidina), derivados de piperidino (por exemplo, delmopinol e octapinol), extrato de magnólia, extrato de sementes de uva, extrato de alecrim,

mentol, geraniol, citral, eucaliptol, antibióticos (por exemplo, augmentina, amoxicilina, tetraciclina, doxiciclina, minociclina, metronidazol, neomicina, canamicina e clindamicina) e/ou quaisquer agentes antibacterianos descritos na Patente Norte-Americana nº 5.776.435, que é incorporada ao presente como referência. Um ou mais agentes antimicrobianos podem estar opcionalmente presentes, por exemplo, a cerca de 0,01-10% em peso (por exemplo, 0,1-3% em peso) na composição de cuidados orais descrita.

[00200] Agente anticálcio ou de controle de tártaro apropriado para uso em uma composição de cuidados orais de acordo com o presente inclui, por exemplo, fosfatos e polifosfatos (por exemplo, pirofosfatos), ácido poliaminopropanossulfônico (AMPS), tri-hidrato citrato de zinco, polipeptídeos (por exemplo, ácidos poliaspártico e poliglutâmico), sulfonatos de poliolefina, fosfatos de poliolefina, difosfonatos (por exemplo, 2,2-difosfonatos de azacicloalcano, tais como ácido azaciclo-heptano-2,2-difosfônico), ácido N-metil azaciclopentano-2,3-difosfônico, ácido etano-1-hidróxi-1,1-difosfônico (EHDP), etano-1-amino-1,1-difosfonato e/ou ácidos fosfonoalcano carboxílicos e seus sais (por exemplo, seus sais de amônio e de metais alcalinos). Sais de fosfato e polifosfato inorgânicos úteis incluem, por exemplo, fosfatos de sódio monobásicos, dibásicos e tribásicos, tripolifosfato de sódio, tetrapolifosfato, pirofosfatos mono, di, tri e tetrassódicos, di-hidrogênio pirofosfato dissódico, trimetafosfato de sódio, hexametafosfato de sódio ou quaisquer desses nos quais o sódio é substituído por potássio ou amônio. Outros agentes anticálcios úteis em certas realizações incluem polímeros de policarboxilato aniônicos (por exemplo, polímeros ou copolímeros de ácido acrílico, anidrido metacrílico e maleico, tais como copolímeros de anidrido maleico e polivinil metil éter). Ainda outros agentes anticálcios úteis incluem agentes sequestrantes, tais como ácidos hidroxicarboxílicos (por exemplo, ácidos cítrico, fumárico, málico, glutárico, oxálico e seus sais) e ácidos aminopolicarboxílicos (por exemplo,

EDTA). Um ou mais agentes de controle do tártaro ou anticálcus podem estar opcionalmente presentes, por exemplo, em cerca de 0,01-50% em peso (por exemplo, cerca de 0,05-25% em peso ou cerca de 0,1-15% em peso) na composição de cuidados orais descrita.

[00201] Tensoativos apropriados para uso em composições de cuidados orais do presente podem ser, por exemplo, aniônicos, não iônicos ou anfotéricos. Tensoativos aniônicos apropriados incluem, sem limitações, sais hidrossolúveis de sulfatos de alquila C<sub>8-20</sub>, monoglicérides sulfonados de ácidos graxos C<sub>8-20</sub>, sarcosinatos e tauratos. Exemplos de tensoativos aniônicos incluem lauril sulfato de sódio, coco monoglicéride sulfonato de sódio, lauril sarcosinato de sódio, lauril isoetionato de sódio, laureth carboxilato de sódio e dodecil benzenossulfonato de sódio. Tensoativos não iônicos apropriados incluem, sem limitações, poloxâmeros, ésteres de polioxietileno sorbitan, etoxilatos de álcoois graxos, etoxilatos de alquilfenol, óxidos de amina terciários, óxidos de fosfina terciários e sulfóxidos de dialquila. Tensoativos anfotéricos apropriados incluem, sem limitações, derivados de aminas secundárias e terciárias alifáticas C<sub>8-20</sub> que contêm um grupo aniônico tal como carboxilato, sulfato, sulfonato, fosfato ou fosfonato. Um exemplo de tensoativo anfotérico apropriado é cocoamidopropil betaína. Um ou mais tensoativos estão opcionalmente presentes em quantidade total de cerca de 0,01-10% em peso (por exemplo, cerca de 0,05-5,0% em peso ou cerca de 0,1-2,0% em peso) na composição de cuidados orais descrita.

[00202] Abrasivo apropriado para uso em composições de cuidados orais do presente pode incluir, por exemplo, sílica (por exemplo, sílica gel, sílica hidratada, sílica precipitada), alumina, fosfatos insolúveis, carbonato de cálcio e abrasivos resinosos (por exemplo, produto de condensação de ureia-formaldeído). Exemplos de fosfatos insolúveis úteis como abrasivos no presente são ortofosfatos, polimetafosfatos e pirofosfatos, incluindo di-hidrato ortofosfato



dicálcico, pirofosfato de cálcio, pirofosfato betacálcico, fosfato tricálcico, polimetafosfato de cálcio e polimetafosfato de sódio insolúvel. Um ou mais abrasivos estão opcionalmente presentes, por exemplo, em quantidade total de cerca de 5-70% em peso (por exemplo, cerca de 10-56% em peso ou cerca de 15-30% em peso) na composição de cuidados orais descrita. O tamanho médio de partícula de abrasivo, em certas realizações, é de cerca de 0,1-30 micra (por exemplo, cerca de 1-20 micra ou cerca de 5-15 micra).

[00203] Composições de cuidados orais em certas realizações podem compreender pelo menos um agente de modificação do pH. Esses agentes podem ser selecionados para acidificar, tornar mais básicos ou tamponar o pH de uma composição até faixa de pH de cerca de 2-10 (por exemplo, pH que varia de 2-8, 3-9, 4-8, 5-7, 6-10 ou 7-9). Exemplos de agentes modificadores do pH úteis no presente incluem, sem limitações, ácidos carboxílico, fosfórico e sulfônico; sais de ácidos (por exemplo, citrato monossódico, citrato dissódico e malato monossódico); hidróxidos de metais alcalinos (por exemplo, hidróxido de sódio, carbonatos tais como carbonato de sódio, bicarbonatos e sesquicarbonatos); boratos; silicatos; fosfatos (por exemplo, fosfato monossódico, fosfato trissódico e sais de pirofosfato); e imidazol.

[00204] Um modulador de espuma apropriado para uso em composições de cuidados orais do presente pode ser, por exemplo, polietileno glicol (PEG). PEGs com alto peso molecular são apropriados, incluindo, por exemplo, aqueles que possuem peso molecular médio de cerca de 200000-7000000 (por exemplo, cerca de 500000-5000000 ou cerca de 1000000-2500000). Um ou mais PEGs estão opcionalmente presentes em quantidade total de cerca de 0,1-10% em peso (por exemplo, cerca de 0,2-5,0% em peso ou cerca de 0,25-2,0% em peso) na composição de cuidados orais descrita.

[00205] Composições de cuidados orais em certas realizações

podem compreender pelo menos um umectante. Umectante, em certas realizações, pode ser um álcool póli-hidríco tal como glicerina, sorbitol, xilitol ou PEG com baixo peso molecular. Os umectantes mais apropriados podem também funcionar como adoçante no presente. Um ou mais umectantes estão opcionalmente presentes, por exemplo, em quantidade total de cerca de 1,0-70% em peso (por exemplo, cerca de 1,0-50% em peso, cerca de 2-25% em peso ou cerca de 5-15% em peso) na composição de cuidados orais descrita.

[00206] Adoçante natural ou artificial pode ser opcionalmente compreendido em uma composição de cuidados orais no presente. Exemplos de adoçantes apropriados incluem dextrose, sacarose, maltose, dextrina, açúcar invertido, manose, xilose, ribose, frutose, levulose, galactose, xarope de milho (por exemplo, xarope de milho com alto teor de frutose ou sólidos de xarope de milho), amido parcialmente hidrolisado, hidrolisato de amido hidrogenado, sorbitol, manitol, xilitol, maltitol, isomalte, aspartame, neotame, sacarina e seus sais, adoçantes intensos com base em dipeptídeos e ciclamatos. Um ou mais adoçantes estão opcionalmente presentes em quantidade total de cerca de 0,005-5,0% em peso, por exemplo, na composição de cuidados orais descrita.

[00207] Adoçante natural ou artificial pode ser opcionalmente compreendido em uma composição de cuidados orais no presente. Exemplos de aromatizantes apropriados incluem baunilha, sálvia, manjerona, óleo de salsa, óleo de hortelã, óleo de canela, óleo de gaultéria (salicilato de metila), óleo de hortelã-pimenta, óleo de trevo, óleo de louro, óleo de anis, óleo de eucalipto, óleos cítricos, óleos de frutas; essências, tais como as derivadas de limão, laranja, lima, toronja, damasco, banana, uva, maçã, morango, cereja ou abacaxi; aromas derivados de grãos e nozes como café, cacau, cola, amendoim ou amêndoa; e aromatizantes adsorvidos e encapsulados. Também são englobados nos aromatizantes do presente ingredientes que fornecem fragrância e/ou outros efeitos sensoriais na boca, incluindo efeitos resfriadores

ou de aquecimento. Esses ingredientes incluem, sem limitações, mentol, acetato de mentila, lactato de mentila, cânfora, óleo de eucalipto, eucaliptol, anetol, eugenol, cássia, oxanona, Irisone®, propenil guaíetol, timol, linalool, benzaldeído, cinamaldeído, N-etil-p-mentan-3-carboxamina, N,2,3-trimetil-2-isopropilbutanamida, 3-(1-mentóxi)-propano-1,2-diol, cinamaldeído glicerol acetal (CGA) e mentona glicerol acetal (MGA). Um ou mais aromatizantes estão opcionalmente presentes, por exemplo, em quantidade total de cerca de 0,01-5,0% em peso (por exemplo, cerca de 0,1-2,5% em peso) na composição de cuidados orais descrita.

[00208] Composições de cuidados orais em certas realizações podem compreender pelo menos um sal de bicarbonato. Pode-se utilizar qualquer bicarbonato oralmente aceitável, incluindo, por exemplo, bicarbonatos de metais alcalinos, tais como bicarbonato de sódio ou potássio e bicarbonato de amônio. Um ou mais sais de bicarbonato estão opcionalmente presentes, por exemplo, em quantidade total de cerca de 0,1-50% em peso (por exemplo, cerca de 1-20% em peso) na composição de cuidados orais descrita.

[00209] Composições de cuidados orais em certas realizações podem compreender pelo menos um agente branqueador e/ou corante. Agente branqueador apropriado é um composto de peróxido tal como qualquer um dos descritos na Patente Norte-Americana nº 8.540.971, que é incorporada ao presente como referência. Corantes apropriados no presente incluem, por exemplo, pigmentos, tinturas, lacas e agentes que fornecem brilho ou capacidade de reflexão específica, tais como agentes perolizantes. Exemplos específicos de corantes úteis no presente incluem talco, mica, carbonato de magnésio, carbonato de cálcio, silicato de magnésio, silicato de alumínio e magnésio, sílica, dióxido de titânio, óxido de zinco; óxidos de ferro vermelhos, amarelos, marrons e pretos; ferrocianato de amônio férrico, violeta de manganês, ultramarinho, mica titaniada e oxiclreto de bismuto. Um ou mais corantes estão

opcionalmente presentes, por exemplo, em quantidade total de cerca de 0,001-20% em peso (por exemplo, cerca de 0,01-10% em peso ou cerca de 0,1-5,0% em peso) na composição de cuidados orais descrita.

[00210] Componentes adicionais que podem ser opcionalmente incluídos em uma composição oral do presente incluem, por exemplo, uma ou mais enzimas (acima), vitaminas e agentes antiadesão. Exemplos de vitaminas úteis no presente incluem vitamina C, vitamina E, vitamina B5 e ácido fólico. Exemplos de agentes antiadesão apropriados incluem inibidores sensores de quórum, ficin e solbrol.

[00211] A presente invenção também se refere a um método de aumento da viscosidade de uma composição aquosa. Este método compreende o contato de pelo menos um composto de dextrano conforme descrito no presente com a composição aquosa.

[00212] A etapa de contato neste método resulta em aumento da viscosidade da composição aquosa, em comparação com a viscosidade da composição aquosa antes da etapa de contato.

[00213] A composição aquosa do presente pode ser, por exemplo, água (por exemplo, água deionizada), solução aquosa ou hidrocoloide. A viscosidade de uma composição aquosa antes da etapa de contato, medida a cerca de 20-25 °C, pode ser, por exemplo, de cerca de 0-10000 cPs (ou qualquer número inteiro de 0-10000 cPs). Como a composição aquosa pode ser hidrocoloide ou similar em certas realizações, deverá ser evidente que o método pode ser utilizado para aumentar a viscosidade de composições aquosas que já são viscosas.

[00214] O contato de dextrano no presente com uma composição aquosa aumenta a viscosidade da composição aquosa em certas realizações. Este aumento da viscosidade pode ser um aumento de pelo menos cerca de 1%, 10%, 100%, 1000%, 100000% ou 1000000% (ou qualquer número inteiro de 1%

a 1000000%), por exemplo, em comparação com a viscosidade da composição aquosa antes da etapa de contato. Deverá ser evidente que percentuais de aumento da viscosidade muito grandes podem ser obtidos com o método descrito quando a composição aquosa possuir pouca a nenhuma viscosidade antes da etapa de contato. O aumento da viscosidade pode ser determinado, por exemplo, comparando-se a viscosidade da composição aquosa obtida por meio do método (ou seja, após a etapa de contato) com a viscosidade da composição aquosa como se houvesse existido antes do método (ou seja, antes da etapa de contato).

[00215] O contato de dextrano no presente com uma composição aquosa aumenta o comportamento de afinamento de corte ou o comportamento de espessamento de corte da composição aquosa em certas realizações. Dextrano modifica reologicamente, portanto, a composição aquosa nessas realizações. O aumento do comportamento de afinamento de corte ou comportamento de espessamento de corte pode ser aumento de pelo menos cerca de 1%, 10%, 100%, 1000%, 100000% ou 1000000% (ou qualquer número inteiro de 1% a 1000000%), por exemplo, em comparação com o comportamento de afinamento de corte ou comportamento de espessamento de corte da composição aquosa antes da etapa de contato. Deverá ser evidente que percentuais de aumento da modificação reológica muito grandes podem ser obtidos com o método descrito quando a composição aquosa possuir pouco a nenhum comportamento reológico antes da etapa de contato.

[00216] A etapa de contato em um método de aumento da viscosidade de uma composição aquosa pode ser realizada por meio de mistura ou dissolução de qualquer dextrano conforme descrito no presente na composição aquosa por qualquer meio conhecido na técnica. Mistura ou dissolução pode ser realizada manualmente, por exemplo, ou com uma máquina (por exemplo, misturador ou combinador industrial, agitador orbital, placa de

agitação, homogeneizador, sonificador e moinho de esferas). Mistura ou dissolução pode compreender uma etapa de homogeneização em certas realizações. Pode-se realizar homogeneização (bem como qualquer outro tipo de mistura) por cerca de 5 a 60, 5 a 30, 10 a 60, 10 a 30, 5 a 15 ou 10 a 15 segundos (ou qualquer número inteiro de 5 a 60 segundos) ou por períodos de tempo mais longos, conforme o necessário para misturar dextrano com a composição aquosa. Pode-se utilizar, por exemplo, um homogeneizador a cerca de 5000 a 30000 rpm, 10000 a 30000 rpm, 15000 a 30000 rpm, 15000 a 25000 rpm (ou qualquer número inteiro de 5000 a 30000 rpm).

[00217] Após a mistura ou dissolução de dextrano do presente em uma composição aquosa, a composição aquosa resultante pode ser filtrada ou não filtrada. Uma composição aquosa preparada com uma etapa de homogeneização, por exemplo, pode ou não ser filtrada.

[00218] Certas realizações do método acima podem ser utilizadas para preparar uma composição aquosa descrita no presente, como produto alimentício (por exemplo, um confeito tal como enchimento de doce), produto farmacêutico (tal como excipiente), produto doméstico (por exemplo, detergente de lavanderia, amaciante de tecidos, detergente de lavadora de pratos), produto de cuidados pessoais (por exemplo, dentífrico que contém água, tal como creme dental) ou produto industrial.

[00219] A presente invenção também se refere a um método de tratamento de material. Este método compreende o contato de um material com uma composição aquosa que compreende pelo menos um composto de dextrano conforme descrito no presente.

[00220] Material colocado em contato com uma composição aquosa em um método de contato do presente pode compreender tecido em certas realizações. Tecido no presente pode compreender fibras naturais, fibras sintéticas, fibras semissintéticas ou quaisquer de suas combinações. Fibra

semissintética do presente é produzida utilizando material de ocorrência natural que tenha sido quimicamente derivado e um de seus exemplos é rayon. Exemplos não limitadores de tipos de tecido no presente incluem tecidos elaborados com (i) fibras celulósicas tais como algodão (por exemplo, tecido de lã, lona, cambraia, chenile, chita, veludo cotelê, cretone, damasco, denim, flanela, guingão, Jacquard, malha, matelassê, Oxford, percal, popeline, plissê, cetim, seersucker, sheer, tecido felpudo, sarja e veludo), rayon (por exemplo, viscose, modal, liocel), linho e Tencel®; (ii) fibras proteináceas tais como fibras de seda, lã e de mamíferos relacionadas; (iii) fibras sintéticas, tais como poliéster, acrílica, nylon e similares; (iv) fibras vegetais longas de juta, linho, rami, coco, paina, sisal, henequén, abacá, cânhamo e cânhamo da Índia; e (v) qualquer combinação de tecido de (i)-(iv). Tecido que compreende uma combinação de tipos de fibras (por exemplo, naturais e sintéticas) inclui, por exemplo, aquelas com uma fibra de algodão e poliéster. Materiais/artigos que contêm um ou mais tecidos do presente incluem, por exemplo, roupas, cortinas, estofados, tapetes, forros de cama, forros de banheiro, toalhas de mesa, sacos de dormir, tendas, interior de carros etc. Outros materiais que compreendem fibras naturais e/ou sintéticas incluem, por exemplo, materiais não tecidos, almofadas, papel e espumas.

[00221] Uma composição aquosa que é colocada em contato com um tecido pode ser, por exemplo, uma composição de cuidados com tecidos (por exemplo, detergente de lavanderia e amaciante de tecidos). Um método de tratamento, em certas realizações, pode ser considerado, portanto, um método de cuidados com tecidos ou método de lavanderia caso empregue uma composição de cuidados com tecidos. Contempla-se uma composição de cuidados com tecidos no presente para realizar um ou mais dos benefícios de cuidados com tecidos a seguir (ou seja, efeitos substantivos na superfície): remoção de rugas, redução de rugas, resistência a rugas, redução do desgaste

de tecidos, resistência do desgaste de tecidos, redução da formação de bolinhas no tecido, maior vida útil do tecido, manutenção da coloração do tecido, redução da descoloração do tecido, redução da transferência de tingimento, restauração da coloração de tecido, redução da sujeira do tecido, liberação de sujeira do tecido, retenção da forma do tecido, aumento da maciez do tecido, antirre deposição de sujeira sobre o tecido, antienvelhecimento na lavagem, melhoria da sensação do tecido e/ou redução da contração do tecido.

[00222] Exemplos de condições (por exemplo, tempo, temperatura, volumes de lavagem/enxágue) para conduzir um método de cuidados com tecidos ou método de lavanderia do presente são descritos em WO 1997/003161 e nas Patentes Norte-Americanas nº 4.794.661, 4.580.421 e 5.945.394, que são incorporadas ao presente como referência. Em outros exemplos, um material que compreende tecido pode ser colocado em contato com uma composição aquosa no presente: (i) por pelo menos cerca de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 ou 120 minutos; (ii) sob temperatura de pelo menos cerca de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ou 95 °C (por exemplo, para lavagem em lavanderia ou enxágue: “fria” a cerca de 15-30 °C, “morna” a cerca de 30-50 °C, “quente” a cerca de 50-95 °C); (iii) sob pH de cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 (por exemplo, faixa de pH de cerca de 2-12 ou cerca de 3-11); (iv) em concentração de sal (tal como NaCl) de pelo menos cerca de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 ou 4,0% em peso; ou qualquer combinação de (i)-(iv).

[00223] A etapa de contato em um método de cuidados com tecidos ou método de lavagem pode compreender, por exemplo, quaisquer etapas dentre lavagem, embebição e/ou enxágue. Contato de um material ou tecido em ainda outras realizações pode ser realizado por qualquer meio conhecido na técnica, tal como dissolução, mistura, agitação, pulverização, tratamento, imersão, fluxo, despejamento, combinação, pintura, revestimento, aplicação,



afixação e/ou comunicação de uma quantidade eficaz de um composto de dextrano no presente com o tecido ou material. Em ainda outras realizações, o contato pode ser utilizado para tratar um tecido para fornecer efeito substantivo na superfície. Da forma utilizada no presente, a expressão "sensação do tecido" ou "sensação" designa a reação sensorial tátil de uma pessoa para o tecido, que pode ser física, fisiológica, psicológica, social ou qualquer de suas combinações. Em uma realização, a sensação do tecido pode ser medida utilizando um sistema PhabrOmeter® para medir o valor relativo da sensação (disponível por meio da Nu Cybertek Inc., Davis CA) (Associação Norte-Americana de Químicos e Corantes de Tecidos (método de teste AATCC 202-2012, *Relative Hand Value of Textiles: Instrumental Method*)).

[00224] Em certas realizações de tratamento de material que compreende tecido, um ou mais componentes do composto de dextrano da composição aquosa são adsorvidos ao tecido. Acredita-se que essa característica torne os compostos de dextrano do presente úteis como agentes antirredeposição e/ou agentes antienvelhecimento em composições de cuidados com tecidos descritas (além do seu efeito de modificação da viscosidade). Um agente antirredeposição ou agente antienvelhecimento do presente ajuda a evitar que a sujeira se redeposite sobre as roupas em água de lavagem após a remoção do solo. Contempla-se ainda que a adsorção de um ou mais compostos de dextrano do presente a um tecido melhore as propriedades mecânicas do tecido.

[00225] A adsorção de um composto de dextrano a tecidos no presente pode ser medida utilizando um método colorimétrico (por exemplo, Dubois et al, 1956, *Anal. Chem.* 28: 350-356; Zemljič et al, 2006, *Lenzinger Berichte* 85: 68-76; ambos incorporados ao presente como referência), por exemplo, ou qualquer outro método conhecido na técnica.

[00226] Outros materiais que podem ser colocados em contato no

método de tratamento acima incluem superfícies podem ser tratadas com um detergente de louça (por exemplo, detergente para lavadora de louças automática ou detergente de louça manual). Exemplos desses materiais incluem superfícies de pratos, copos, potes, panelas, assadeiras, utensílios e talheres feitos de cerâmica, porcelana, metal, vidro, plástico (por exemplo, polietileno, polipropileno, poliestireno etc.) e madeira (coletivamente denominados no presente "louça"). O método de tratamento em certas realizações pode, portanto, ser considerado, por exemplo, um método de lavagem de pratos ou método de lavagem de louça. Exemplos de condições (por exemplo, tempo, temperatura e volume de lavagem) para conduzir um método de lavagem de pratos ou de lavagem de louça no presente são descritos na Patente Norte-Americana nº 8.575.083, que é incorporada ao presente como referência. Em outros exemplos, artigos de louça podem ser colocados em contato com uma composição aquosa do presente sob um conjunto apropriado de condições, tais como quaisquer das descritas acima com relação ao contato de um material que compreende tecido.

[00227] Outros materiais que podem ser colocados em contato no método de tratamento acima incluem superfícies orais, tais como qualquer superfície mole ou dura dentro da cavidade oral, incluindo as superfícies da língua, palato duro e mole, mucosa bucal, gengiva e superfícies dentais (por exemplo, dente natural ou superfície dura de dentição artificial, tal como coroa, tampa, enchimento, ponte, dentadura ou implante dental). Em certas realizações, o método de tratamento pode, portanto, ser considerado, por exemplo, um método de cuidado oral ou um método de cuidado dental. As condições (por exemplo, tempo e temperatura) de contato de superfície oral com uma composição aquosa do presente deverão ser apropriadas para o propósito pretendido de elaboração desse contato. Outras superfícies que podem ser colocadas em contato em um método de tratamento também incluem uma superfície do sistema integumentar, tal como pele, cabelo ou unhas.

[00228] Certas realizações da presente invenção referem-se, portanto, a material (por exemplo, tecido) que compreende um composto de dextrano no presente. Esse material pode ser produzido, por exemplo, seguindo-se um método de tratamento de materiais conforme descrito no presente. Um material pode compreender um composto de dextrano em certas realizações, caso o composto seja adsorvido ou colocado em contato de outra forma com a superfície do material.

[00229] Certas realizações de um método de tratamento de material do presente compreendem adicionalmente uma etapa de secagem, na qual o material é seco após ser colocado em contato com a composição aquosa. Uma etapa de secagem pode ser realizada diretamente após a etapa de contato ou após uma ou mais etapas adicionais que poderão seguir-se à etapa de contato (por exemplo, secagem de tecido após ser enxaguado, por exemplo em água, seguindo-se a uma lavagem em uma composição aquosa do presente). A secagem pode ser realizada por meio de qualquer um dentre vários meios conhecidos na técnica, tais como secagem em ar (por exemplo, cerca de 20-25 °C) ou sob temperatura de, por exemplo, pelo menos cerca de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 170, 175, 180 ou 200 °C. Um material que foi seco no presente contém tipicamente menos de 3, 2, 1, 0,5 ou 0,1% em peso de água nele compreendida. O tecido é um material preferido para condução de uma etapa de secagem opcional.

[00230] Uma composição aquosa utilizada em um método de tratamento do presente pode ser qualquer composição aquosa descrita no presente, tal como nas realizações acima ou nos Exemplos abaixo. O(s) componente(s) de dextrano de uma composição aquosa podem, portanto, ser quaisquer conforme descrito no presente. Exemplos de composições aquosas incluem detergentes (por exemplo, detergente de lavanderia ou detergente de pratos) e dentífricos que contêm água, como creme dental.

[00231] A presente invenção também se refere a uma reação enzimática que compreende água, sacarose e uma enzima glicosiltransferase que compreende ou consiste de uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 9, SEQ ID Nº 13 ou SEQ ID Nº 17. A enzima glicosiltransferase sintetiza dextrano conforme descrito no presente. De forma significativa, o dextrano sintetizado nessa reação gtf exibe alta viscosidade em composições aquosas, mesmo sob concentrações relativamente baixas do dextrano. Acredita-se que esse perfil de alta viscosidade seja exclusivo em comparação com os perfis de viscosidade de polímeros de dextrano descritos anteriormente.

[00232] Dextrano sintetizado em uma reação enzimática do presente pode ser conforme caracterizado (por exemplo, peso molecular, ligação e perfil de ramificação) na descrição acima com relação a dextrano produzido por uma enzima glicosiltransferase. Uma enzima glicosiltransferase em uma reação enzimática do presente pode ser conforme caracterizado na descrição acima com relação a dextrano produzido por uma enzima glicosiltransferase.

[00233] Uma ou mais enzimas de glicosiltransferase diferentes podem ser utilizadas em uma reação enzimática no presente. Uma única enzima glicosiltransferase (por exemplo, gtf 0768) é utilizada em alguns casos, ao contrário de situações nas quais diversas enzimas podem estar presentes (por exemplo, fermentação de levedura ou bacteriana). Uma reação enzimática pode ser caracterizada (por exemplo, concentração inicial de sacarose e tipo de sacarose, pH, temperatura, tempo) na descrição acima com relação a dextrano produzido por uma enzima glicosiltransferase. Além disso, quaisquer características descritas no presente ou um método de produção de dextrano podem aplicar-se a uma reação de glicosiltransferase.

[00234] A presente invenção também se refere a um método de produção de dextrano que compreende a etapa de contato de pelo menos água,

sacarose e uma enzima glicosiltransferase que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 9, SEQ ID Nº 13 ou SEQ ID Nº 17. Esta etapa de contato resulta na produção de dextrano conforme descrito no presente. Dextrano produzido na etapa de contato pode ser opcionalmente isolado.

[00235] Dextrano sintetizado em um método de síntese do presente pode ser conforme caracterizado (por exemplo, peso molecular, ligação e perfil de ramificação) na descrição acima com relação a dextrano produzido por uma enzima glicosiltransferase. Uma enzima glicosiltransferase em um método de síntese do presente pode ser caracterizada na descrição acima com relação a dextrano produzido por uma enzima glicosiltransferase. Quaisquer características de uma reação enzimática descrita no presente podem aplicar-se ao método de síntese do presente.

[00236] A etapa de contato em um método do presente de produção de dextrano compreende o fornecimento de uma reação enzimática que compreende água, sacarose e qualquer enzima glicosiltransferase descrita no presente. A etapa de contato do método descrito pode ser realizada em qualquer uma dentre uma série de formas. A quantidade desejada de sacarose pode ser primeiramente dissolvida, por exemplo, em água (opcionalmente, outros componentes podem também ser adicionados neste estágio de preparação, tais como componentes tampão), seguida pela adição de uma ou mais enzimas glicosiltransferase. A solução pode ser mantida em repouso ou agitada, por exemplo, por meio de agitação ou agitação orbital.

[00237] A reação pode ser e tipicamente é livre de células. Dextrano no presente não é, portanto, isolado de uma célula, tal como uma bactéria (por exemplo, *L. mesenteroides*), em alguns aspectos.

[00238] A realização de uma reação de glicosiltransferase em certas realizações pode ser medida, por exemplo, determinando-se se a

viscosidade de reação não está mais aumentando e/ou medindo-se a quantidade de sacarose mantida na reação (sacarose residual), em que percentual de consumo de sacarose de mais de cerca de 90% pode indicar o término da reação. Tipicamente, uma reação do processo descrito pode levar cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 ou 96 horas até o término. O tempo de reação pode depender, por exemplo, de certos parâmetros como a quantidade de sacarose e enzima glicosiltransferase utilizada na reação.

[00239] O rendimento de dextrano produzido em uma reação de glicosiltransferase em certas realizações pode ser de cerca ou pelo menos cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% ou 45%, com base no peso da sacarose utilizada na reação.

[00240] Dextrano produzido no método descrito pode ser opcionalmente isolado. Dextrano pode, por exemplo, ser precipitado com álcool (por exemplo, 90-100% metanol, etanol ou isopropanol) e, em seguida, separado do sobrenadante, que pode compreender água, frutose e, opcionalmente, um ou mais dentre sacarose residual e subproduto (por exemplo, glicose, leucrose e outros oligossacarídeos solúveis). Essa separação pode ser realizada, por exemplo, por meio de centrifugação ou filtragem. Dextrano precipitado pode ser opcionalmente lavado uma ou mais vezes (por exemplo, 2-4 vezes; duas, três, quatro ou mais vezes) com álcool (por exemplo, 70-100% ou pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% de metanol, etanol ou isopropanol). Em outros exemplos, isolamento de dextrano pode compreender o uso de um método de ultrafiltração e/ou diálise (ou seja, método de corte de peso molecular), tal como descrito no Pedido de Patente Norte-Americano publicado nº 2014/0142294 e na Patente Norte-Americana nº 6.977.249, que são incorporados ao presente como referência. Medições de certas características de dextrano no presente (por exemplo, perfil de ligação e peso molecular) podem ser realizadas com dextrano isolado conforme acima, se desejado.

[00241] Acredita-se que o método de síntese de dextrano do presente seja útil para produzir dextrano com maior ou menor viscosidade, dependendo da quantidade de sacarose utilizada no método. De forma geral, quanto mais baixa a concentração de sacarose utilizada em uma reação de glicosiltransferase, mais alta a viscosidade do produto de dextrano e vice-versa. Qualquer concentração de sacarose descrita no presente pode ser utilizada em uma reação de glicosiltransferase, em que o produto de dextrano da reação possui viscosidade que é maior que a de um produto de dextrano produzido em uma reação que compreende concentração de sacarose mais alta e vice-versa. Em certos aspectos, qualquer viscosidade descrita no presente pode ser utilizada para caracterizar realizações desse método e o aumento da viscosidade pode ser pelo menos cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 150, 200 ou 250 vezes maior. Enzima glicosiltransferase em certas realizações deste método pode ser gtf 0768 (que compreende SEQ ID Nº 1 ou sequências relacionadas).

[00242] Exemplos não limitadores de composições e métodos descritos no presente incluem:

1. Composição que compreende dextrano, em que o dextrano compreende:
  - i. cerca de 87-93% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 6;
  - ii. cerca de 0,1-1,2% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 3;
  - iii. cerca de 0,1-0,7% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 4;
  - iv. cerca de 7,7-8,6% em peso de glicose ligada nas posições 1, 3 e 6; e
  - v. cerca de 0,4-1,7% em peso de glicose ligada em:
    - a. posições 1, 2 e 6; ou

- b. posições 1, 4 e 6;

em que o peso molecular ponderal médio (Mw) do dextrano é de cerca de 50-200 milhões de Daltons, o raio médio z de giração do dextrano é de cerca de 200-280 nm e o dextrano opcionalmente não é um produto de uma enzima glicosiltransferase de *Leuconostoc mesenteroides*.

2. Composição de acordo com a realização 1, em que o dextrano compreende:

- i. cerca de 89,5-90,5% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 6;
- ii. cerca de 0,4-0,9% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 3;
- iii. cerca de 0,3-0,5% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 4;
- iv. cerca de 8,0-8,3% em peso de glicose ligada nas posições 1, 3 e 6; e
- v. cerca de 0,7-1,4% em peso de glicose ligada em:
  - a. posições 1, 2 e 6; ou
  - b. posições 1, 4 e 6.

3. Composição de acordo com qualquer das realizações 1 ou 2, em que o dextrano compreende cadeias ligadas entre si em uma estrutura de ramificação, em que as cadeias possuem comprimento similar e compreendem substancialmente ligações alfa-1,6-glicosídicas.

4. Composição de acordo com qualquer das realizações 1, 2 ou 3, em que o comprimento médio das cadeias é de cerca de 10-50 unidades monoméricas.

5. Composição de acordo com qualquer das realizações 1, 2, 3 ou 4, em que o dextrano é um produto da enzima glicosiltransferase que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a



SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 9, SEQ ID Nº 13 ou SEQ ID Nº 17.

6. Composição de acordo com qualquer das realizações 1, 2, 3, 4 ou 5, em que a composição é uma composição aquosa que possui viscosidade de pelo menos cerca de 25 cPs.

7. Composição de acordo com qualquer das realizações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, em que o Mw do dextrano é de cerca de 80-120 milhões de Daltons.

8. Composição de acordo com qualquer das realizações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, em que o raio médio z de giração do dextrano é de cerca de 230-250 nm.

9. Composição de acordo com qualquer das realizações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, em que a composição encontra-se na forma de produto alimentício, produto de cuidados pessoais, produto farmacêutico, produto doméstico ou produto industrial.

10. Composição de acordo com a realização 9, em que a composição encontra-se na forma de confeito.

11. Método de aumento da viscosidade de composições aquosas, em que o método compreende: contato de dextrano conforme definido em qualquer das realizações 1 a 8 com a composição aquosa, em que a viscosidade da composição aquosa é aumentada pelo dextrano em comparação com a viscosidade da composição aquosa antes da etapa de contato.

12. Método de tratamento de material, em que o método compreende: contato de um material com uma composição aquosa que compreende dextrano conforme definido em qualquer das realizações 1 a 8.

13. Reação enzimática que compreende água, sacarose e uma enzima glicosiltransferase que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 5, SEQ ID Nº 9, SEQ ID Nº 13 ou SEQ ID Nº 17, em que a enzima glicosiltransferase

sintetiza dextrano conforme definido em qualquer das realizações 1 a 8.

14. Método de produção de dextrano, em que o método compreende:

a. contato de pelo menos água, sacarose e uma enzima glicosiltransferase que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 13 ou SEQ ID N° 17, em que é produzido dextrano conforme definido em qualquer das realizações 1 a 8; e

b. isolamento opcional do dextrano produzido na etapa (a).

15. Método de acordo com a realização 14, em que a viscosidade do dextrano produzido no método aumenta com a redução da quantidade de sacarose na etapa (a).

### **EXEMPLOS**

[00243] A presente invenção é adicionalmente definida nos Exemplos 1-6 e 8-11. Dever-se-á compreender que esses Exemplos, embora indiquem certos aspectos preferidos da presente invenção, são fornecidos unicamente como forma de ilustração. A partir da discussão acima e desses Exemplos, os técnicos no assunto podem determinar as características essenciais da presente invenção e, sem abandonar o seu espírito e escopo, realizar diversas mudanças e modificações para adaptar a presente invenção a vários usos e condições.

[00244] Métodos gerais:

[00245] Clonagem e expressão de enzimas glicosiltransferase em *Bacillus subtilis*:

[00246] Cada glicosiltransferase utilizada nos Exemplos 3-6 foi preparada conforme segue.

[00247] Um plasmídeo que codifica a enzima gtf (pZZHB582, pZZHB583, pZZHB584 ou pZZHB585, que permitem a expressão de gtf e

secreção de *B. subtilis*; vide as Figs. 2A-D) foi amplificado utilizando o Kit de Amplificação Illustra TempliPhi® 100 (GE Healthcare Life Sciences, NJ). Células de *B. subtilis* competentes ( $\Delta$ spolIE,  $\Delta$ aprE,  $\Delta$ nprE, degUHy32,  $\Delta$ scoC,  $\Delta$ nprB,  $\Delta$ vpr,  $\Delta$ epr,  $\Delta$ wprA,  $\Delta$ mpr,  $\Delta$ ispA,  $\Delta$ bpr) foram transformadas com o produto de amplificação. As células foram colocadas sobre placas Luria Agar suplementadas com 5 ppm de cloranfenicol. Colônias da placa de transformação foram inoculadas em 5 ml de meio LB e incubadas a 37 °C por uma noite. Parcelas (25-50 µl) de cada cultivo foram transferidas em seguida para frascos de agitação de 250 ml contendo 30 ml de meio Grant's II suplementado com 5 ppm de cloranfenicol e incubado a 30 °C com agitação (280 rpm) por 24 horas. As células foram colhidas por meio de centrifugação a 14000 rpm por uma hora. Os sobrenadantes foram analisados por meio de SDS-PAGE para determinar produto de gtf secretado e adicionalmente dialisados três vezes contra uma solução que contém 20 mM de Tris, pH 7,5 por um total de vinte horas. Amostras dialisadas foram repartidas a 25 ml por tubo centrífugo cônico de 50 ml e os tubos foram colocados em ângulo a -80 °C por cerca de uma hora. Após o congelamento das amostras, a tampa do tubo foi removida e substituída por PARAFILM que foi perfurado 5-10 vezes com uma agulha de alto calibre. As amostras congeladas cobertas por PARAFILM foram liofilizadas em um sistema de secagem por congelamento FreeZone® (Labconco Corp., Kansas City MO) de acordo com as instruções do fabricante.

[00248] Soluções padrão de enzimas glicosiltransferase:

[00249] Uma solução padrão de enzimas foi elaborada para cada gtf adicionando-se 10 ml de H<sub>2</sub>O em grau molecular a cada tubo centrífugo cônico de 50 ml contendo pó de enzimas liofilizadas.

### **EXEMPLO 1**

[00250] Expressão de glicosiltransferase (0768) em *E. coli* e produção de lisato de enzimas brutas ativas:

[00251] Este Exemplo descreve a expressão de uma enzima glicosiltransferase (gtf) madura em *E. coli*. Lisato de células brutas de uma linhagem de expressão de *E. coli* foi produzido e exibiu atividade de formação de produto de gel na presença de sacarose.

[00252] Uma suposta hidrolase que contém repetição de YG (classificada no GENBANK como GI número 339480768, mas agora com GI número 497964659) com 1484 aminoácidos foi identificada a partir da linhagem KCTC3652 de *Leuconostoc pseudomesenteroides* por meio de sequenciamento genômico completo. Esta suposta glicosiltransferase (denominada no presente gtf 0768) pertence à família GH70 de glicosil hidrolases que contêm um domínio de ligação de glucano. O segmento de 37 aminoácidos N-terminal de gtf 0768 foi deduzido como peptídeo de sinal da enzima pelo programa SIGNALP 4.0 (Petersen et al, *Nature Methods* 8: 785-786). A forma madura de gtf 0768 é representada por SEQ ID Nº 1.

[00253] Para construir um plasmídeo para expressão bacteriana de gtf 0768, uma sequência de DNA que codifica uma forma madura do gtf sem o peptídeo de sinal foi sintetizada por GenScript USA Inc. (Piscataway NJ). A sequência sintetizada foi subclonada nos locais NheI e HindIII do vetor pET23D+ (NOVAGEN®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). O gtf 0768 (SEQ ID Nº 2) codificado por esta construção incluiu uma metionina inicial e três aminoácidos adicionais (Ala-Ser-Ala) no terminal N e seis resíduos de histidina no terminal C, em comparação com a forma madura (prevista) do tipo selvagem de gtf 0768 (SEQ ID Nº 1) (ou seja, SEQ ID Nº 1 está compreendido em SEQ ID Nº 2). A construção de plasmídeo foi confirmada por sequência e transformada em células hospedeiras BL21 DE3 de *E. coli* com seleção de ampicilina, resultando na linhagem de expressão EC0052.

[00254] Células de EC0052 e uma linhagem controle que

contêm apenas vetor pET23D+ vazias foram cultivadas em meio LB com 100 µg/ml de ampicilina até OD<sub>600</sub> de cerca de 0,5 e induzidas em seguida com 1 mM IPTG a 37 °C por três horas ou alternativamente induzidas a 23 °C por uma noite. Após esse período de indução, as células foram coletadas por meio de centrifugação a 4000xg por dez minutos e novamente suspensas em tampão PBS, pH 6,8. As células foram lisadas em seguida por meio de passagem através de prensa francesa a 14000 psi (cerca de 96,53 MPa) por duas vezes, após o quê o fragmento celular foi peletizado por meio de centrifugação a 15000xg por vinte minutos. Os sobrenadantes de cada lisato celular bruto foram parcelados e congelados a -80 °C.

[00255]A atividade de lisato de células brutas de células EC0052 foi verificada por meio de reação com sacarose. Foi configurada uma reação controle de forma similar, utilizando lisato celular preparado a partir de células que contêm o vetor vazio. Cada reação de sacarose foi configurada utilizando 10% (v/v) de lisato celular com 100 g/l de sacarose, 10 mM de citrato de sódio com pH 5 e 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. Após incubação das reações a 37 °C por algumas horas, formou-se um produto em forma de gel, que se acredita ser dextrano, no tubo no qual havia sido adicionado o lisato celular EC0052. Nenhum produto em forma de gel formou-se na reação controle. Análise de HPLC confirmou que sacarose foi consumida na reação contendo lisato celular EC0052 e não na reação controle. Este resultado sugeriu que o lisato de células brutas EC0052 expressou enzima gtf 0768 ativa e que esse gtf gerou um produto de dextrano que possui alta viscosidade.

[00256]Reações que compreendem água, sacarose e enzima que compreende SEQ ID N° sintetizaram, portanto, um produto de gelificação, que se acredita ser dextrano. Este resultado demonstrou que gtf 0768 provavelmente possui atividade de glicosiltransferase.

**EXEMPLO 2**

[00257] Reação de sacarose com Gtf 0768 e análise de produto de reação de dextrano gelificante:

[00258] Este Exemplo descreve reações adicionais que compreendem água, sacarose e gtf 0768, suplementando os resultados fornecidos no Exemplo 1. Além disso, este Exemplo fornece análise de ligação glicosídica do produto gelificante sintetizado por gtf 0768, o que demonstra que este produto é um tipo de dextrano.

[00259] Reagentes para preparar reações de gtf:

- sacarose (Sigma Prod. nº S-9378);
- estoque tampão de fosfato de sódio (200 mM) (pH 5,5):

prepare 250 ml em água utilizando mono-hidrato monobásico fosfato de sódio (Sigma Prod. nº S9638) e hepta-hidrato dibásico fosfato de sódio (Sigma Prod. nº S9390), adequadamente; e

- solução de enzima Gtf 0768 (lisato celular conforme preparado no Exemplo 1).

[00260] Condições de três reações de gtf:

[00261] Foram preparados 1000 ml de reação contendo 2,72 g de estoque tampão de fosfato de sódio (pH 5,5), 100 g/l de sacarose e 2 ml de solução de enzima gtf 0768. A reação foi agitada a 26 °C por vinte horas e tornou-se viscosa. A enzima gtf foi desativada por meio de aquecimento da reação a 80 °C por dez minutos. A reação viscosa desativada foi misturada em seguida com três litros de metanol a 100% para precipitar o produto viscoso. Formou-se um precipitado branco, que foi filtrado em seguida, seguido por quatro lavagens com 120 ml de metanol a 100%. O produto sólido foi seco à temperatura ambiente a vácuo em forno por 72 horas.

[00262] Foram preparados 725 ml de reação contendo 1,97 g de tampão de fosfato de sódio, 300 g/l de sacarose e 1,45 ml de solução de enzima

gtf 0768. A reação foi agitada a 26 °C por vinte horas e tornou-se viscosa. A enzima gtf foi desativada por meio da adição de metanol à mistura de reação. A reação desativada foi misturada em seguida com três litros de metanol a 100% para precipitar o produto viscoso. Formou-se um precipitado branco, que foi filtrado em seguida, seguido por quatro lavagens com 120 ml de metanol a 100%. O produto sólido foi seco à temperatura ambiente a vácuo em forno por 72 horas.

[00263] Foram preparados 200 ml de reação contendo 0,544 g de tampão de fosfato de sódio, 400 g/l de sacarose e 0,4 ml de solução de enzima gtf 0768. A reação foi agitada a 26 °C por vinte horas e tornou-se viscosa. A enzima gtf foi desativada por meio da adição de metanol à mistura de reação. A reação desativada foi misturada em seguida com três litros de metanol a 100% para precipitar o produto viscoso. Formou-se um precipitado branco, que foi filtrado em seguida, seguido por quatro lavagens com 120 ml de metanol a 100%. O produto sólido foi seco à temperatura ambiente a vácuo em forno por 72 horas.

[00264] Foram preparados 200 ml de reação contendo 0,544 g de tampão de fosfato de sódio, 800 g/l de sacarose e 0,4 ml de solução de enzima gtf 0768. A reação foi agitada a 26 °C por vinte horas e tornou-se viscosa. A enzima gtf foi desativada por meio da adição de metanol à mistura de reação. A reação desativada foi misturada em seguida com três litros de metanol a 100% para precipitar o produto viscoso. Formou-se um precipitado branco, que foi filtrado em seguida, seguido por quatro lavagens com 120 ml de metanol a 100%. O produto sólido foi seco à temperatura ambiente a vácuo em forno por 72 horas.

[00265] Amostras (100 µl) de cada reação foram retiradas após 0, 2, 4 e 18 horas, respectivamente. A enzima gtf foi desativada em cada amostra por meio de aquecimento a 80 °C por dez minutos. Cada amostra foi diluída em seguida dez vezes com água e centrifugada a 14000 rpm por cinco minutos, após o quê 200 µl de sobrenadante foram utilizados para análise de HPLC para medir o consumo de sacarose durante a reação. As condições de HPLC a seguir

foram aplicadas para análise de cada amostra: coluna (coluna de carboidrato AMINEX HPX-87C, 3800 x 7,8 mm, Bio-Rad, nº 125-0095), eluente (água), velocidade de fluxo (0,6 ml/min), temperatura (85 °C) e detector de índice de refração. Análise de HPLC das amostras indicou consumo substancial de sacarose durante a reação de 0768 gtf (Fig. 1, reação que compreende 100 g/l de sacarose) (esse consumo de sacarose ocorreu significativamente mais rápido que o consumo de sacarose observado em reação utilizando dextrano sucrase obtida de fonte comercial; consulte o Exemplo 7).

[00266] Também se utilizou HPLC para analisar outros produtos da reação que compreende 100 g/l de sacarose. O rendimento de polímero foi retrocalculado subtraindo-se a quantidade de todos os outros sacarídeos mantidos na reação a partir da quantidade da sacarose inicial. O número retrocalculado foi consistente com a análise de peso seco de produto viscoso. Sacarose, leucrose, glicose e frutose foram quantificadas por meio de HPLC com uma coluna HPX-87C (condições de HPLC conforme descrito acima). Dissacarídeos DP2-7 foram quantificados por meio de HPLC com as condições a seguir: coluna (coluna de carboidrato AMINEX HPX-42A, 300 x 7,8 mm, Bio-Rad, nº 125-0097), eluente (água), velocidade de fluxo (0,6 ml/min), temperatura (85 °C) e detector de índice de refração. Essas análises de HPLC indicaram que os produtos de sacarídeo que contêm glicosila da reação de 0768 gtf consistiram de 91% de produto de polímero, 1% de glicose, 6,5% de leucrose e 1,5% de oligossacarídeos DP2-7.

[00267] O perfil de ligação glicosídica do produto de polímero gelificante da reação que compreende 100 g/l de sacarose foi determinado por meio de NMR <sup>13</sup>C. Polímero seco (25-30 mg) conforme preparado acima foi dissolvido em 1 ml de DMSO deuterado contendo 3% em peso de LiCl com agitação a 50 °C. Utilizando uma pipeta de vidro, 0,8 ml da preparação foram transferidos para um tubo de NMR de 5 mm. Espectro de NMR <sup>13</sup>C quantitativo



foi obtido utilizando um espectrômetro de NMR de 500 MHz Bruker Avance (Billerica MA) equipado com uma criossonda CPDul, em frequência de espectro de 125,76 MHz, utilizando uma janela espectral de 26041,7 Hz. Uma sequência de pulsos de desacoplamento com fechamento inverso utilizando desacoplamento WALTZ foi empregada com tempo de obtenção de 0,629 segundos, atraso entre pulsos de cinco segundos e 6000 pulsos. Os dados de domínio de tempo foram transformados utilizando multiplicação exponencial de 2,0 Hz.

[00268] Os resultados de NMR indicaram que o produto de polímero gelificante compreendia cerca de 90% de ligações alfa-1,6 glicosídicas, cerca de 4-5% de ligações alfa-1,3 glicosídicas e cerca de 5-6% de ligações alfa-1,4 e 1-2 glicosídicas. A(s) cadeia(s) principal(is) do produto de polímero aparentemente compreende(m) principalmente ligações alfa-1,6 glicosídicas, mas também uma quantidade muito pequena de ligações alfa-1,3 e 1,4 glicosídicas. Outras ligações alfa-1,3 e 1,4 glicosídicas e todas as ligações alfa-1,2 glicosídicas aparentemente encontram-se em ramos que saem da(s) cadeia(s) principal(is). O produto gelificante aparentemente é, portanto, dextrano gelificante.

[00269] Um protocolo diferente (não o procedimento NMR <sup>13</sup>C acima) é atualmente recomendado no presente para determinar o perfil de ligação de dextrano produzido por gtf 0768. Este protocolo é descrito abaixo no Exemplo 9, que indica um perfil de ligação similar ao descrito neste Exemplo.

[00270] O peso molecular numérico médio (Mn) e o peso molecular ponderal médio (Mw) do produto dextrano gelificante da reação que compreende 100 g/l de sacarose foi determinado por meio de cromatografia de exclusão de tamanhos (SEC). Polímero seco conforme preparado acima foi dissolvido em DMAc e 5% LiCl (0,5 mg/ml) com agitação por uma noite a 100 °C. O sistema cromatográfico utilizado foi um módulo de separação Alliance® 2695 da Waters

Corporation (Milford MA) acoplado a três detectores online: refratômetro diferencial 2410 da Waters, fotômetro de difusão de luz multiangular Heleos® 8+ da Wyatt Technologies (Santa Barbara CA) e viscosímetro capilar diferencial ViscoStar® da Wyatt. As colunas utilizadas para SEC foram quatro colunas de estireno-divinilbenzeno da Shodex (Japão) e duas colunas KD-806M, KD-802 e KD-801 para aumentar a resolução na região de baixo peso molecular de uma distribuição de polímero. A fase móvel foi DMAc com 0,11% de LiCl. As condições cromatográficas utilizadas foram de 50 °C na coluna e nos compartimentos detectores, 40 °C na amostra e no compartimento injetor, velocidade de fluxo de 0,5 ml/min e volume de injeção de 100 µl. Os pacotes de software utilizados para redução de dados foram Empower® versão 3 da Waters (calibragem com padrão de polímero de glucano amplo) e Astra® versão 6 da Wyatt (método de detecção tripla com calibragem de coluna). Determinou-se a partir desse procedimento que o produto de dextrano gelificante possuía Mn de 2229400 e Mw de 5365700.

[00271] Um protocolo diferente (não o procedimento SEC acima) é atualmente recomendado no presente para determinar o peso molecular de dextrano produzido por gtf 0768. Este protocolo é descrito abaixo no Exemplo 9, que indica peso molecular mais de uma ordem de magnitude maior que o peso molecular descrito neste Exemplo.

[00272] Reações que compreendem água, sacarose e uma enzima que compreende SEQ ID N° 1, portanto, sintetizaram um produto de dextrano gelificante, conforme determinado pelo perfil de ligação alfa-1,6 glicosídica predominante do produto. O Exemplo 8 abaixo descreve a comparação da viscosidade desse produto em comparação com as viscosidades de certos dextranos disponíveis comercialmente. O Exemplo 9 descreve a produção adicional de dextrano com uma enzima gtf que compreende SEQ ID N° 1, em conjunto com o rendimento, peso molecular e análise de ligação do dextrano.

### **EXEMPLO 3**

[00273] Expressão de glicosiltransferase (2919) e seu uso para gerar um produto de dextrano gelificante:

[00274] Este Exemplo descreve a expressão de uma enzima glicosiltransferase (gtf) de *Weissella cibaria* madura em *B. subtilis*. Além disso, este Exemplo demonstra que essa enzima gera um produto gelificante, provavelmente um dextrano, quando utilizada em uma reação que contém água e sacarose.

[00275] Um gene de glicosiltransferase, WciGtf1, foi identificado a partir de *Weissella cibaria* KACC 11862. A sequência de ácidos nucleicos desse gene (posições 23315 a 27661 de Acesso GENBANK nº NZ\_AEKT01000035.1) é definida em SEQ ID Nº 3 e codifica a sequência de proteínas de SEQ ID Nº 4 (Acesso GENBANK nº ZP\_08417432). No terminal N da proteína WciGtf1 (SEQ ID Nº 4) é um peptídeo de sinal de 26 aminoácidos, conforme previsto pelo programa SIGNALP 4.0 (Petersen et al, *Nature Methods* 8: 785-786). Isso indica que WciGtf1 (SEQ ID Nº 4) é uma proteína secretada. A forma secretada madura da proteína WciGtf1 é definida no presente como 2919 gtf e é descrita em SEQ ID Nº 5.

[00276] A sequência de nucleotídeos que codifica 2919 gtf foi otimizada para expressão em *B. subtilis*. A sequência otimizada (SEQ ID Nº 6) foi sintetizada pela Generay (Xangai, China) e inserida no plasmídeo p2JM103BBI (Vogtentanz et al, *Protein Expr. Purif.* 55: 40-52), resultando no plasmídeo pZZHB583 (Fig. 2A). O plasmídeo pZZHB583 contém um promotor aprE ligado operativamente a uma sequência que codifica (i) uma sequência de sinal aprE utilizada para dirigir a secreção de proteína heteróloga (2919 gtf neste caso) em *B. subtilis*, (ii) Ala-Gly-Lys para facilitar a secreção e (iii) 2919 gtf (SEQ ID Nº 5 (i-iii são fundidos entre si na direção de amino para carbóxi).

[00277] O plasmídeo pZZHB583 foi transformado em células de *B.*

*subtilis* para expressão e purificação de 2919 gtf (vide Métodos Gerais).

[00278] A atividade de 2919 gtf (SEQ ID N° 5) foi determinada em reação de 250 ml à temperatura ambiente que compreende 100 g/l de sacarose, 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH 5,5) e 6,25 ml de estoque de enzimas. A reação foi conduzida à temperatura ambiente com agitação (150 rpm) por 48 horas.

[00279] Amostras (100 µl) foram retiradas da reação após 0, 1, 3, 5, 24 e 48 horas, respectivamente. A enzima foi desativada por meio de aquecimento de cada amostra a 80 °C por dez minutos. As amostras foram diluídas por dez vezes com água e centrifugadas a 14000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante (200 µl) foi utilizado para análise HPLC.

[00280] As concentrações de leucrose, glicose e frutose na região gtf foram determinadas utilizando HPLC, que foi realizada com sistema de cromatografia Agilent 1260 equipado com uma coluna AMINEX HPX-87C (300 x 7,8 mm) colocada em um compartimento de coluna com termostato a 85 °C e um detector de índice de refração. Conduziu-se eluição de HPLC com água Milli-Q® a 0,6 ml/min. Sacarose, leucrose, glicose e frutose foram identificadas por meio de comparação com padrões correspondentes. As suas concentrações foram calculadas com base em curvas padrão de área de pico. A sacarose foi consumida quase completamente ao final da reação. Além de produto de dextrano viscoso, 2919 gtf (SEQ ID N° 5) produziu principalmente frutose (cerca de 50%) e pequenas quantidades de leucrose (cerca de 5%) e glicose (cerca de 1%).

[00281] A concentração de oligossacarídeos (DP2-DP7) na reação de gtf foi determinada por meio de análise de HPLC, que foi realizada com um sistema de cromatografia Agilent 1260 equipado com uma coluna AMINEX HPX-42A (300 x 7,8 mm) colocada em um compartimento de coluna com termostato a 85 °C e um detector de índice de refração. Conduziu-se eluição de HPLC com água Milli-Q® a

0,6 ml/min. A formação de oligossacarídeos foi identificada por meio de comparação com padrões correspondentes. A concentração dos oligossacarídeos foi calculada com base em curvas padrão da área de pico. 2919 gtf (SEQ ID Nº 5) produziu uma pequena quantidade de oligossacarídeos DP2-DP7 (cerca de 3%) ao final da reação.

[00282] Reações que compreendem água, sacarose e uma enzima que compreende SEQ ID Nº 5 sintetizaram, portanto, um produto de gelificação, que se acredita ser polímero de dextrano. Resultados experimentais demonstraram que gtf 2919 provavelmente possuem atividade de glicosiltransferase.

#### **EXEMPLO 4**

[00283] Expressão de glicosiltransferase (2918) e seu uso para gerar um produto de dextrano gelificante:

[00284] Este Exemplo descreve a expressão de uma enzima glicosiltransferase (gtf) de *Lactobacillus fermentum* madura em *B. subtilis*. Além disso, este Exemplo demonstra que essa enzima gera um produto gelificante, provavelmente um dextrano, quando utilizado em uma reação que contém água e sacarose.

[00285] Gene de glicosiltransferase, LfeGtf1, foi identificado a partir de *Lactobacillus fermentum*. A sequência de ácidos nucleicos desse gene (posições 618 a 5009 de Acesso GENBANK nº AY697433.1) é definida em SEQ ID Nº 7 e codifica a sequência de proteínas de SEQ ID Nº 8 (Acesso GENBANK nº AAU08008). No terminal N da proteína LfeGtf1 (SEQ ID Nº 8), encontra-se um peptídeo de sinal de 37 aminoácidos, conforme previsto pelo programa SIGNALP 4.0. Isso indica que LfeGtf1 (SEQ ID Nº 8) é uma proteína secretada. A forma secretada madura da proteína LfeGtf1 é definida no presente como 2918 gtf e é descrita em SEQ ID Nº 9.

[00286] A sequência de nucleotídeos que codifica 2918 gtf foi otimizada para expressão em *B. subtilis*. A sequência otimizada (SEQ ID Nº 10)

foi sintetizada pela Generay (Xangai, China) e inserida no plasmídeo p2JM103BBI, resultando no plasmídeo pZZHB582 (Fig. 2B). O plasmídeo pZZHB582 contém um promotor aprE ligado operativamente a uma sequência que codifica (i) uma sequência de sinal aprE utilizada para dirigir a secreção de proteína heteróloga (2918 gtf neste caso) em *B. subtilis*, (ii) Ala-Gly-Lys para facilitar a secreção e (iii) 2918 gtf (SEQ ID Nº 9) (i-iii são fundidos entre si na direção de amino para carbóxi).

[00287] O plasmídeo pZZHB582 foi transformado em células de *B. subtilis* para expressão e purificação de 2918 gtf (vide Métodos Gerais).

[00288] A atividade de 2918 gtf (SEQ ID Nº 9) foi determinada em reação de 250 ml à temperatura ambiente que compreende 100 g/l de sacarose, 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH 5,5) e 6,25 ml de estoque de enzimas. A reação foi conduzida à temperatura ambiente com agitação (150 rpm) por seis dias.

[00289] Amostras (100 µl) foram retiradas da reação após 0, 1, 3, 5, 24, 48 e 144 horas, respectivamente. A enzima foi desativada por meio de aquecimento de cada amostra a 80 °C por dez minutos. As amostras foram diluídas por dez vezes com água e centrifugadas a 14000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante (200 µl) foi utilizado para análise de HPLC.

[00290] As concentrações de sacarose, leucrose, glicose, frutose e oligossacarídeos (DP2-DP7) na região gtf foram determinadas utilizando procedimentos de HPLC conforme descrito no Exemplo 3. A sacarose foi consumida quase completamente ao final da reação. Além de produto de dextrano viscoso, 2918 gtf (SEQ ID Nº 9) produziu principalmente frutose (cerca de 50%) e pequenas quantidades de leucrose (cerca de 5%) e glicose (cerca de 1%). 2918 gtf (SEQ ID Nº 9) produziu uma pequena quantidade de oligossacarídeos DP2-DP7 (cerca de 1%).

[00291] Reações que compreendem água, sacarose e uma enzima

que compreende SEQ ID Nº 9 sintetizaram, portanto, um produto de gelificação, que se acredita ser polímero de dextrano. Resultados experimentais demonstraram que gtf 2920 provavelmente possui atividade de glicosiltransferase.

### **EXEMPLO 5**

[00292] Expressão de glicosiltransferase (2920) e seu uso para gerar um produto de dextrano gelificante:

[00293] Este Exemplo descreve a expressão de uma enzima glicosiltransferase (gtf) de *Streptococcus sobrinus* em *B. subtilis*. Além disso, este Exemplo demonstra que essa enzima produz um produto gelificante, provavelmente um dextrano, quando utilizado em uma reação que contém água e sacarose.

[00294] Um gene glicosiltransferase, SsoGtf4, foi identificado a partir de *Streptococcus sobrinus* B13N. A sequência de ácidos nucleicos desse gene (posições 198 a 4718 de Acesso GENBANK nº AY966490) é definida em SEQ ID Nº 11 e codifica a sequência de proteínas de SEQ ID Nº 12 (Acesso GENBANK nº AAX76986). No terminal N da proteína SsoGtf4 (SEQ ID Nº 12) é um peptídeo de sinal de 41 aminoácidos, conforme previsto pelo programa SIGNALP 4.0. Isso indica que SsoGtf4 (SEQ ID Nº 12) é uma proteína secretada. A forma secretada madura da proteína SsoGtf4 é definida no presente como 2920 gtf e é descrita em SEQ ID Nº 13.

[00295] A sequência de nucleotídeos que codifica 2920 gtf foi otimizada para expressão em *B. subtilis*. A sequência otimizada (SEQ ID Nº 14) foi sintetizada pela Generay (Xangai, China) e inserida no plasmídeo p2JM103BBI, resultando no plasmídeo pZZHB584 (Fig. 2C). O plasmídeo pZZHB584 contém um promotor aprE ligado operativamente a uma sequência que codifica (i) uma sequência de sinal aprE utilizada para dirigir a secreção de proteína heteróloga (2920 gtf neste caso) em *B. subtilis*, (ii) Ala-Gly-Lys para

facilitar a secreção e (iii) 2920 gtf (SEQ ID N° 13) (i-iii são fundidos entre si na direção de amino para carbóxi).

[00296]O plasmídeo pZZHB584 foi transformado em células de *B. subtilis* para expressão e purificação de 2920 gtf (vide Métodos Gerais).

[00297]A atividade de 2920 gtf (SEQ ID N° 13) foi determinada em reação de 250 ml à temperatura ambiente que compreende 100 g/l de sacarose, 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH 5,5) e 6,25 ml de estoque de enzimas. A reação foi conduzida à temperatura ambiente com agitação (150 rpm) por seis dias.

[00298]Amostras (100 µl) foram retiradas da reação após 0, 1, 3, 5, 24, 48, 72 e 144 horas, respectivamente. A enzima foi desativada por meio de aquecimento de cada amostra a 80 °C por dez minutos. As amostras foram diluídas por dez vezes com água e centrifugadas a 14000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante (200 µl) foi utilizado para análise de HPLC.

[00299]As concentrações de sacarose, leucrose, glicose, frutose e oligossacarídeos (DP2-DP7) na reação de gtf foram determinadas utilizando procedimentos de HPLC conforme descrito no Exemplo 3. A sacarose foi consumida quase completamente ao final da reação. Além de produto de dextrano viscoso, 2920 gtf (SEQ ID N° 13) produziu principalmente frutose (cerca de 50%), leucrose (cerca de 20%) e uma pequena quantidade de glicose (cerca de 3%). 2920 gtf (SEQ ID N° 13) produziu uma pequena quantidade de oligossacarídeos DP2-DP7 (cerca de 1%).

[00300]Reações que compreendem água, sacarose e uma enzima que compreende SEQ ID N° 13 sintetizaram, portanto, um produto de gelificação, que se acredita ser polímero de dextrano. Resultados experimentais demonstraram que gtf 2920 provavelmente possui atividade de glicosiltransferase.



### **EXEMPLO 6**

[00301] Expressão de glicosiltransferase (2921) e seu uso para gerar um produto de dextrano gelificante:

[00302] Este Exemplo descreve a expressão de uma enzima glicosiltransferase (gtf) de *Streptococcus downei* madura em *B. subtilis*. Além disso, este Exemplo demonstra que essa enzima gera um produto gelificante, provavelmente um dextrano, quando utilizado em uma reação que contém água e sacarose.

[00303] Um gene glicosiltransferase, SdoGtf7, foi identificado a partir de *Streptococcus downei* MFe28. A sequência de ácidos nucleicos desse gene (posições 16 a 2375 de Acesso GENBANK nº AB476746) é definida em SEQ ID Nº 15 e codifica a sequência de proteínas de SEQ ID Nº 16 (Acesso GENBANK nº ZP\_08549987.1). No terminal N da proteína SdoGtf7 (SEQ ID Nº 16), encontra-se um peptídeo de sinal de 44 aminoácidos, conforme previsto pelo programa SIGNALP 4.0. Isso indica que a proteína SdoGtf7 (SEQ ID Nº 16) é uma proteína secretada. A forma secretada madura da proteína SdoGtf7 é definida no presente como 2921 gtf e é descrita em SEQ ID Nº 17.

[00304] A sequência de nucleotídeos que codifica 2921 gtf foi otimizada para expressão em *B. subtilis*. A sequência otimizada (SEQ ID Nº 18) foi sintetizada pela Generay (Xangai, China) e inserida no plasmídeo p2JM103BBI, resultando no plasmídeo pZZHB585 (Fig. 2D). O plasmídeo pZZHB585 contém um promotor aprE ligado operativamente a uma sequência que codifica (i) uma sequência de sinal aprE utilizada para dirigir a secreção de proteína heteróloga (2921 gtf neste caso) em *B. subtilis*, (ii) Ala-Gly-Lys para facilitar a secreção e (iii) 2921 gtf (SEQ ID Nº 17) (i-iii são fundidos entre si na direção de amino para carbóxi).

[00305] O plasmídeo pZZHB585 foi transformado em células de *B. subtilis* para expressão e purificação de 2921 gtf (vide Métodos Gerais).

[00306] A atividade de 2921 gtf (SEQ ID N° 17) foi determinada em reação de 250 ml à temperatura ambiente que compreende 100 g/l de sacarose, 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH 5,5) e 6,25 ml de estoque de enzimas. A reação foi conduzida à temperatura ambiente com agitação (150 rpm) por oito dias.

[00307] Amostras (100 µl) foram retiradas da reação no início da reação e após uma, duas, três, seis, sete e oito dias, respectivamente. A enzima foi desativada por meio de aquecimento de cada amostra a 80 °C por dez minutos. As amostras foram diluídas por dez vezes com água e centrifugadas a 14000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante (200 µl) foi utilizado para análise de HPLC.

[00308] As concentrações de sacarose, leucrose, glicose, frutose e oligossacarídeos (DP2-DP7) na reação de gtf foram determinadas utilizando procedimentos de HPLC conforme descrito no Exemplo 3. Cerca de 43% de sacarose permaneceram na reação no dia 8. Além de produto de dextrano viscoso, 2921 gtf (SEQ ID N° 17) produziu principalmente frutose (cerca de 31%), leucrose (cerca de 6%) e glicose (cerca de 3%). Não se observou produção óbvia de oligossacarídeos DP2-DP7.

[00309] Reações que compreendem água, sacarose e uma enzima que compreende SEQ ID N° 17 sintetizaram, portanto, um produto de gelificação, que se acredita ser polímero de dextrano. Resultados experimentais demonstraram que gtf 2921 provavelmente possui atividade de glicosiltransferase.

#### **EXEMPLO 7 (COMPARATIVO)**

[00310] Produção de dextrano utilizando dextrano sucrase disponível comercialmente:

[00311] Este Exemplo descreve a síntese de dextrano utilizando dextrano sucrase disponível comercialmente em reações que compreendem

água e sacarose. O dextrano produzido neste exemplo foi analisado no Exemplo 8 em comparação com os produtos de dextrano gelificantes sintetizados nos Exemplos 1-6.

[00312] Reagentes para preparação da reação de dextrano sucrose:

- sacarose (Sigma Prod. nº S-9378); foram preparados 400 g/l de solução padrão;
- estoque tampão de fosfato de sódio (200 mM) (pH 5,5): prepare 250 ml em água utilizando mono-hidrato monobásico fosfato de sódio (Sigma Prod. nº S9638) e hepta-hidrato dibásico fosfato de sódio (Sigma Prod. nº S9390), adequadamente; e
- dextrano sucrose, pó liofilizado,  $\geq 100$  unidades/mg de proteína, de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma Prod. nº D9909).

[00313] Foi preparada uma reação de 50 ml contendo 20 mM de fosfato de sódio (pH 5,5), 110 g/l de sacarose e dez unidades de dextrano sucrose da Sigma-Aldrich. A dextrano sucrose foi adicionada por último durante a preparação da reação. A reação foi conduzida em um frasco de agitação tampado de 125 ml a 26 °C com agitação (100 rpm) por sete dias. Amostras (100 µl) da reação foram retiradas após 0, 3, 6, 24, 48 e 168 horas, respectivamente. A dextrano sucrose foi desativada em cada amostra por meio de aquecimento a 80 °C por dez minutos. Cada amostra foi diluída em seguida dez vezes com água e centrifugada a 14000 rpm por cinco minutos, após o quê 200 µl de sobrenadante foram utilizados para análise de HPLC para medir o consumo de sacarose durante a reação.

[00314] As condições de HPLC a seguir foram aplicadas para análise de cada amostra: coluna (coluna de carboidrato AMINEX HPX-87C, 300 x 7,8 mm, Bio-Rad, nº 125-0095), eluente (água), velocidade de fluxo (0,6 ml/min), temperatura (85 °C), detector de índice de refração. Análise de HPLC

das amostras indicou consumo de sacarose durante a reação de dextrano sucrase (Fig. 3). É importante observar que a velocidade de consumo de sacarose pela dextrano sucrase comercial foi muito mais baixa em comparação com a velocidade de consumo de sacarose de gtf 0768 (Exemplo 2). Especificamente, embora gtf 0768 esgotasse a maior parte da sacarose após tempo de reação de cerca de 17-18 horas (Fig. 1), dextrano sucrase comercial esgotou apenas cerca de 20% de sacarose nesse mesmo período de tempo e necessitou de cerca de 168 horas para esgotar sacarose, no todo ou em sua maior parte.

[00315] Também se utilizou HPLC para analisar outros produtos da reação. O rendimento de dextrano foi retrocalculado subtraindo-se a quantidade de todos os outros sacarídeos mantidos na reação a partir da quantidade da sacarose inicial. O número retrocalculado foi consistente com a análise de peso seco de dextrano. Sacarose, leucrose, glicose, frutose e dissacarídeos DP2-7 foram quantificados por meio de HPLC conforme descrito no Exemplo 2. Essas análises de HPLC indicaram que os produtos de sacarídeo da reação de dextrano sucrase comercial consistiram de 49% de dextrano, 0,3% de sacarose, 44% de frutose, 1% de glicose, 5% de leucrose e 1% de oligossacarídeos DP2-7.

[00316] O dextrano produzido neste exemplo foi analisado no Exemplo 8 em comparação com os produtos de dextrano gelificantes sintetizados nos Exemplos 1-6.

### **EXEMPLO 8**

[00317] Viscosidade de amostras de dextrano:

[00318] Este Exemplo descreve a medição das viscosidades dos polímeros de dextrano produzidos nos Exemplos 1-7, bem como a viscosidade de dextrano obtido de uma fonte comercial. Medições de viscosidade foram realizadas em diversas velocidades de corte.

[00319] Amostras de polímeros de dextrano foram preparadas conforme descrito nos Exemplos 1-7. Especificamente, foram conduzidas reações enzimáticas e, em seguida, o polímero foi precipitado em metanol, lavado com metanol (100%) quatro vezes e seco em seguida. Soluções (2% em peso e/ou 3% em peso) de cada amostra foram preparadas por meio de adição da quantidade apropriada de polímero a água deionizada (DI). Cada preparação foi misturada em seguida utilizando um turbilhonador de bancada até que o polímero se encontrasse completamente em solução. Cada uma dessas amostras é indicada nas Tabelas 2 e 3 (abaixo) como “após PPT” (após precipitação). Uma solução a 2% em peso de dextrano ( $M_w = 956978$ ) obtida da TCI America (Portland OR; catálogo nº D0061) foi preparada de forma similar; esse dextrano é denominado a seguir “dextrano comercial”.

[00320] Para determinar a viscosidade de cada solução de polímero em diversas velocidades de corte, cada solução foi submetida a várias velocidades de corte utilizando um viscosímetro enquanto a temperatura era mantida constante a 20 °C. Além disso, amostras de polímero obtidas diretamente, sem precipitação, de cada uma das reações enzimáticas descritas nos Exemplos 1-7 foram submetidas a diversas velocidades de corte (indicadas nas Tabelas 2 e 3 como “antes de PPT”). A velocidade de corte aumentou utilizando um programa de gradiente que aumentou de 0 para 10 rpm e a velocidade de corte aumentou em 0,17 (1/s) a cada trinta segundos. Os resultados deste experimento encontram-se relacionados na Tabela 2.

## **TABELA 2**

[00321] Viscosidade de certas soluções de dextrano em diversas velocidades de corte:

Amostra de dextrano <sup>a</sup>	Viscosidad e (cPs) a 0,17 rpm	Viscosidad e (cPs) a 1,03 rpm	Viscosidad e (cPs) a 2,62 rpm	Viscosidad e (cPs) a 4,22 rpm
Gtf 0768 (SEQ ID N <sup>o</sup> 1) Antes de PPT (Exemplo 2, 100 g/l reação de sacarose)	47976,13	11376,70	12956,11	14390,76
Gtf 0768 (SEQ ID N <sup>o</sup> 1) Após PPTW – 3% em peso (Exemplo 2, 100 g/l reação de sacarose)		15778,40	6245,31 <sup>b</sup>	4119,58 <sup>b</sup>
Gtf 0768 (SEQ ID N <sup>o</sup> 1) Após PPT – 2% em peso (Exemplo 2, 100 g/l reação de sacarose)		4091,84	3417,10	2874,10
Gtf 2918 (SEQ ID N <sup>o</sup> 9) Antes de PPT (Exemplo 4)		n/a <sup>b</sup>	n/a <sup>b</sup>	n/a <sup>b</sup>
Gtf 2919 (SEQ ID N <sup>o</sup> 5) Antes de PPT		98864	38671	25580

Amostra de dextrano <sup>a</sup>	Viscosidad e (cPs) a 0,17 rpm	Viscosidad e (cPs) a 1,03 rpm	Viscosidad e (cPs) a 2,62 rpm	Viscosidad e (cPs) a 4,22 rpm
(Exemplo 3)				
Gtf 2920 (SEQ ID N° 13) Antes de PPT (Exemplo 5)		3874,85	4205,66	4119,58 <sup>b</sup>
Gtf 2920 (SEQ ID N° 13) Após PPT – 3% em peso (Exemplo 5)		6168,76	3294,43	2288,24
Gtf 2921 (SEQ ID N° 17) Antes de PPT (Exemplo 6)		3533,86	2143,72	1748,95
Gtf 2921 (SEQ ID N° 17) Após PPT – 3% em peso (Exemplo 6)		4634,32	2780,4	1984,89
Dextrano sucrase comercial Antes de PPT (Exemplo 7)	16759,42			

<sup>a</sup> Amostras de polímero são relacionadas de acordo com a enzima

correspondente utilizada para sintetizar a amostra.

<sup>b</sup> A medição foi realizada fora dos limites de especificação do viscosímetro.

[00322] Amostras de polímero foram também submetidas a diversas velocidades de corte mais altas utilizando um viscosímetro, enquanto a temperatura era mantida constante a 20 °C. A velocidade de corte aumentou utilizando um programa de gradiente que aumentou de 10 para 250 rpm e a velocidade de corte aumentou em 7,36 (1/s) a cada vinte segundos. Os resultados deste experimento são relacionados na Tabela 3.

**TABELA 3**

[00323] Viscosidade de certas soluções de dextrano em diversas velocidades de corte:

Amostra de dextrano <sup>a</sup>	Viscosidade (cPs) a 14,72 rpm	Viscosidade (cPs) a 102,9 rpm	Viscosidade (cPs) a 250 rpm
Gtf 2918 (SEQ ID N° 9) Após PPT – 3% em peso (Exemplo 4)	149,95	69,68	48,97
Gtf 2919 (SEQ ID N° 5) Após PPT – 3% em peso (Exemplo 3)	80,82	41,23	29,49
2% em peso dextrano comercial	241,41	105,28	68,88



Amostra de dextrano <sup>a</sup>	Viscosidade (cPs) a 14,72 rpm	Viscosidade (cPs) a 102,9 rpm	Viscosidade (cPs) a 250 rpm
Dextrano sucrase comercial Após PPT – 2% em peso (Exemplo 7)	11,09 <sup>b</sup>	10,31 <sup>b</sup>	8,27
	Viscosidade (cPs) a 14,11 rpm	Viscosidade (cPs) a 98,69 rpm	Viscosidade (cPs) a 162,1 rpm
Gtf 0768 (SEQ ID N° 1) Após PPT – 2% em peso (Exemplo 2, 400 g/l reação de sacarose)	49,89	23,61	18,32
Gtf 0768 (SEQ ID N° 1) Após PPT – 2% em peso (Exemplo 2, 800 g/l reação de sacarose)	5,44	2,72	1,58

<sup>a</sup> Amostras de polímero são relacionadas de acordo com a enzima correspondente utilizada para sintetizar a amostra. Alternativamente, analisou-se dextrano obtido de uma fonte comercial (“dextrano comercial”).

<sup>b</sup> A medição foi realizada fora dos limites de especificação do

viscômetro.

[00324] Estes dados demonstram que soluções do produto de dextrano de uma glicosiltransferase que compreende SEQ ID Nº 1 podem, na maioria dos casos, exibir viscosidade mais alta, mesmo após precipitação e solução, em comparação com as viscosidades de dextrano obtido comercialmente e do produto de dextrano de uma dextrano sucrose obtida comercialmente. Esta observação aparentemente também se aplica aos produtos de polímero correspondentes de glicosiltransferases que compreendem SEQ ID Nº 5, 9, 13 ou 17.

[00325] Também vale a pena observar que, com base nas Tabelas 2-3, à medida que a quantidade de sacarose em uma reação gtf 0768 é reduzida de 800 g/l para 100 g/l, a viscosidade do produto de dextrano aparentemente aumenta. Especificamente, a Tabela 3 indica (a 14,11 rpm/2% em peso de carga) viscosidades de 5,44 cPs e 49,89 cPs para produtos de dextrano de reações que compreendem 800 e 400 g/l de sacarose, respectivamente, e a Tabela 2 (gtf 0768, 2% em peso de carga) pode indicar viscosidade de cerca de 957 cPs (exponencial extrapolado em rotação de 14,11 rpm) para produto de dextrano de uma reação que compreende 100 g/l de sacarose. Este resultado sugere que a viscosidade de um produto de dextrano pode ser controlada por meio de modificação do nível de sacarose fornecido inicialmente à reação.

#### **EXEMPLO 9**

[00326] Produção adicional e análise de dextrano sintetizado por Gtf0768:

[00327] Este Exemplo é adicional ao Exemplo 2, que descreve outra reação que compreende água, sacarose e gtf 0768. Além disso, este Exemplo fornece análises adicionais de ligação e peso molecular do produto gelificante sintetizado por gtf 0768, o que demonstra que este produto é um tipo de dextrano.

[00328] Reagentes para preparar reações de gtf:

- sacarose (Sigma Prod. nº S-9378);
- tampão de fosfato de sódio padrão (1 M, pH 6,5, Teknova Cat. nº S0276); e
- solução de enzima Gtf 0768 (lisato celular conforme preparado no Exemplo 1).

[00329] Condições de reação de Gtf:

[00330] Foram preparados 50 ml de reação contendo 20 mM de tampão de fosfato de sódio (o tampão foi diluído cinquenta vezes com ddH<sub>2</sub>O a partir de 1 M padrão, pH 6,5), 100 g/l de sacarose e 0,1 ml de solução de enzima gtf 0768. A reação foi agitada a 100 rpm em um agitador incubador (Innova, Modelo 4000) a 26 °C por 43 horas e a reação tornou-se viscosa após cerca de 24 horas.

[00331] A enzima gtf foi desativada por meio de aquecimento da reação a 80 °C por dez minutos. A reação viscosa desativada foi misturada em seguida com 75 ml de metanol a 100% para precipitar o produto viscoso. Formou-se um precipitado branco. Após decantação cuidadosa do sobrenadante, o precipitado branco foi lavado duas vezes com 75 ml de metanol a 100%. O produto sólido foi seco a 45 °C a vácuo em forno por 48 horas.

[00332] Amostras (1 ml) da reação foram retiradas após 0, 0,5, 1, 2 e 24 horas, respectivamente. A enzima gtf foi desativada em cada amostra por meio de aquecimento a 80 °C por dez minutos. Cada amostra foi diluída em seguida dez vezes com água estéril. 500 µl de amostra diluída foram transferidos para um filtro de tubo de centrifugação (SPIN-X, 0,45 µm de Nylon, 2,0 ml de tubo de polipropileno, Costar nº 8170) e centrifugados a 12.000 rpm em uma centrífuga de mesa por 60 minutos, após o quê 200 µl de fluxo foram utilizados para análise de HPLC, para medir o consumo de sacarose durante a reação. As condições de HPLC a seguir foram aplicadas para análise de cada amostra:

coluna (coluna de carboidrato AMINEX HPX-87C, 300 x 7,8 mm, Bio-Rad, nº 125-0095), eluente (água), velocidade de fluxo (0,6 ml/min), temperatura (85 °C), detector de índice de refração. Análise de HPLC das amostras indicou consumo substancial de sacarose durante a reação de 0768 gtf.

[00333] Também se utilizou HPLC para analisar outros produtos da reação. O rendimento de polímero foi retrocalculado subtraindo-se a quantidade de todos os outros sacarídeos mantidos na reação a partir da quantidade da sacarose inicial. O número retrocalculado foi consistente com a análise de peso seco de produto viscoso. Sacarose, leucrose, glicose e frutose foram quantificadas por meio de HPLC com coluna HPX-87C (condições de HPLC conforme descrito acima). Oligossacarídeos DP2-7 foram quantificados por meio de HPLC com as condições a seguir: coluna (coluna de carboidrato AMINEX HPX-42A, 300 x 7,8 mm, Bio-Rad, nº 125-0097), eluente (água), velocidade de fluxo (0,6 ml/min), temperatura (85 °C), detector de índice de refração. Essas análises de HPLC indicaram que os produtos de sacarídeo que contêm glicosila da reação de 0768 gtf consistiram de 92,3% de produto de polímero, 1,3% de glicose, 5,0% de leucrose e 1,4% de oligossacarídeos DP2-7.

[00334] Uma amostra de produto em pó de dextrano seco (cerca de 0,2 g) da reação acima foi utilizada para análise do peso molecular. Peso molecular foi determinado por meio de método cromatográfico de injeção de fluxo utilizando um módulo de separação Alliance® 2695 da Waters Corporation (Milford MA) acoplado a três detectores online: refratômetro diferencial 2414 da Waters, fotômetro de difusão de luz multiangular (MALS) com 18 ângulos Heleos®-2 com detector de difusão de luz semielástico (QELS) da Wyatt Technologies (Santa Barbara CA) e viscosímetro capilar diferencial ViscoStar® da Wyatt. O pó de dextrano seco foi dissolvido a 0,5 mg/ml em tampão Tris (Tris(hidroximetil)aminometano) aquoso (0,075 M) contendo 200 ppm de NaN<sub>3</sub>. A dissolução de dextrano foi atingida por meio de agitação por uma noite a 50

°C. Duas colunas AQUAGEL-OH GUARD da Agilent Technologies (Santa Clara CA) foram utilizadas para separar o pico de polímero de dextrano do pico de injeção. A base móvel para este procedimento foi a mesma do solvente de dextrano, a velocidade de fluxo foi de 0,2 ml/min, o volume de injeção foi de 0,1 ml e a temperatura de coluna foi de 30 °C. Software Empower® versão 3 da Waters foi utilizado para obtenção de dados e software Astra® versão 6 da Wyatt foi utilizado para redução de dados de multidetectores. Determinou-se a partir desse trabalho que o produto de polímero de dextrano apresentou peso molecular (Mw) ponderal médio de  $1,022 (+/- 0,025) \times 10^8$  g/mol (ou seja, cerca de 100 milhões de Daltons) (da análise de MALS), raio de giracção médio z de 243,33 (+/- 0,42) nm (por meio de análise de MALS) e raio hidrodinâmico médio z de 215 nm (por meio de análise de QELS). Determinou-se também por meio de análise de QELS que o dextrano possui desvio padrão de distribuição de tamanhos de partículas (PSD) de cerca de 0,259, o que indica que o dextrano provavelmente é polidisperso em termos de tamanho hidrodinâmico.

[00335] Para fins de análise de ligação glicosídica, 50 ml de reação de gtf foram preparados conforme descrito acima neste Exemplo, exceto pelo tempo de reação de 24 horas (a reação havia se tornado viscosa). A enzima gtf foi desativada por meio de aquecimento da reação a 80 °C por dez minutos. A reação viscosa desativada foi colocada em seguida em tubulação de diálise resistente de celulose regenerada com corte de peso molecular (MWCO) de 12-14 kDa (tubulação de diálise Spectra/Por® 4, Parte nº 132706, Spectrum Laboratories, Inc.) e dialisada contra 4 l de água filtrada à temperatura ambiente por uma semana. A água foi substituída todos os dias durante essa diálise. A reação viscosa dialisada foi precipitada em seguida e seca conforme descrito acima neste Exemplo. Cerca de 0,2 g de pó seco foram submetidos a análise de ligação de GC/MS.

[00336] Realizou-se análise de ligação de acordo com os métodos

descritos por Pettolino et al (*Nature Protocols* 7: 1590-1607), que são incorporados ao presente como referência. Resumidamente, uma amostra de dextrano seca foi dissolvida em sulfóxido de dimetila (DMSO) ou cloreto de lítio a 5% em DMSO e, em seguida, todos os grupos hidroxila livres foram metilados por meio de adição sequencial de uma calda de hidróxido de sódio e DMSO seguida por iodometano. O polímero metilado foi extraído em seguida em cloreto de metileno e hidrolisado em unidades monoméricas, utilizando ácido trifluoroacético (TFA) aquoso a 120 °C. O TFA foi evaporado em seguida a partir da amostra e realizou-se abertura de anéis redutores utilizando borodeutereto de sódio, que também marcou a extremidade redutora com um átomo de deutério. Os grupos hidroxila criados por meio de hidrólise das ligações glicosídicas foram acetilados em seguida por meio de tratamento com cloreto de acetila e TFA sob temperatura de 50 °C. Por fim, os reagentes de derivação foram evaporados e os monômeros acetilados/metilados resultantes foram reconstituídos em acetonitrila e analisados por meio de cromatografia de gases com espectrometria de massa (GC/MS) utilizando uma coluna de biscianopropil cianopropilfenil polissiloxano. O posicionamento relativo das funcionalidades metila e acetila, em conjunto com a marca de deutério, gerou substâncias que possuem índices de tempo de retenção distintos e espectros de massa que podem ser comparados com bancos de dados publicados. Desta forma, os derivados das unidades monoméricas indicaram como cada monômero era ligado originalmente no polímero de dextrano e se o monômero era um ponto de ramificação. Os resultados da análise dessas amostras (dextrano inicialmente dissolvido em DMSO ou DMSO/5% LiCl) são fornecidos na Tabela 4.

#### **TABELA 4**

[00337]Perfil de ligação de produto de dextrano Gtf 0768:

	% peso/% molar de monômeros de glicose em dextrano				
Amostra	3-glc <sup>a</sup>	6-glc <sup>b</sup>	4-glc <sup>c</sup>	3,6-glc <sup>d</sup>	2,6- + 4,6-glc <sup>e</sup>
DMSO	0,4	90,2	0,4	8,3	0,7
DMSO/5% LiCl	0,9	89,3	0,4	8,0	1,4

<sup>a</sup> Monômero de glicose ligado nas posições de carbono 1 e 3.

<sup>b</sup> Monômero de glicose ligado nas posições de carbono 1 e 6.

<sup>c</sup> Monômero de glicose ligado nas posições de carbono 1 e 4.

<sup>d</sup> Monômero de glicose ligado nas posições de carbono 1, 3 e 6.

<sup>e</sup> Monômero de glicose ligado nas posições de carbono 1, 2 e 6 ou 1, 4 e 6.

[00338] De forma geral, os resultados da Tabela 4 indicam que o produto de dextrano analisado acima compreende:

- i. cerca de 87-93% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 6;
- ii. cerca de 0,1-1,2% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 3;
- iii. cerca de 0,1-0,7% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1 e 4;
- iv. cerca de 7,7-8,6% em peso de glicose ligada apenas nas posições 1, 3 e 6; e
- v. cerca de 0,4-1,7% em peso de glicose ligada apenas (a) nas posições 1, 2 e 6; ou (b) nas posições 1, 4 e 6.

[00339] Com base nesta informação e em alguns outros estudos (dados não exibidos), contempla-se que este produto seja uma estrutura ramificada na qual existem cadeias longas (que contêm, no todo ou em sua maioria, ligações alfa-1,6) ou cerca de 20 DP de comprimento (médio) que se ramificam iterativamente entre si (por exemplo, uma cadeia longa pode ser uma ramificação de outra cadeia longa que, por sua vez, pode ser um ramo de outra

cadeia longa e assim por diante). A estrutura ramificada aparentemente também compreende ramos curtos das cadeias longas; acredita-se que essas cadeias curtas tenham 1-3 DP de comprimento e compreendam, em sua maioria, por exemplo, ligações alfa-1,3 e 1,4. Pontos de ramificação no dextrano, seja de ramificação de cadeia longa de outra cadeia longa ou ramificação de cadeia curta de uma cadeia longa, aparentemente compreendem ligações alfa-1,3, 1,4 ou 1,2 de uma glicose envolvida em ligação alfa-1,6. Cerca de 25% de todos os pontos de ramificação do dextrano ramificaram-se em uma cadeia longa.

[00340] Reações que compreendem água, sacarose e uma enzima que compreende SEQ ID N° 1, portanto, sintetizaram um produto de dextrano gelificante muito grande, conforme determinado pelo alto Mw e perfil de ligação alfa-1,6 glicosídica predominante do produto.

#### **EXEMPLO 10**

[00341] Formulação que compreende dextrano sintetizado por Gtf 0768:

[00342] Este Exemplo descreve uma formulação que compreende o produto de dextrano de gtf 0768. Demonstrou-se que essa formulação possui melhores características sensoriais (ou “sensação”) em comparação com formulações que compreendem certos compostos (goma xantana, Carbopol®) comumente utilizados para fornecer viscosidade para certos produtos de consumo (por exemplo, composições de cuidados pessoais tais como loções).

[00343] Três emulsões diferentes foram preparadas e comparadas entre si em um estudo de sensação na pele, conforme segue.

[00344] Emulsão com base em dextrano: dextrano foi produzido utilizando gtf 0768 (que compreende SEQ ID N° 1) em reação similar à reação descrita no Exemplo 9. À temperatura ambiente, polissorbato 80, mono-oleato de sorbitan e óleo mineral (Fase B, Tabela 5) foram combinados em um pequeno recipiente e misturados manualmente até a homogeneidade. A Fase B foi



lentamente adicionada a água (Fase A, Tabela 5) sob mistura propelente moderada. A mistura foi homogeneizada a 5000-9000 rpm por cerca de 5-10 minutos. Dextrano (Fase C, Tabela 5) foi adicionado em seguida sob mistura propelente moderada. Germaben® II (Fase D, Tabela 5) foi adicionado em seguida como conservante sob mistura propelente moderada. O dextrano poderia haver sido opcionalmente hidratado previamente utilizando uma parte da água da fase A.

**TABELA 5**

[00345] Emulsão com base em dextrano:

Ingredientes	% Atividade	% em peso (desejado)	% em peso (puro)	Gramas
Fase A				
Água (deionizada)			73,50	73,50
Fase B				
Polissorbato 80	100,00	2,43	2,43	2,43
Mono-oleato de sorbitan	100,00	2,57	2,57	2,57
Óleo mineral	100,00	20,00	20,00	20,00
Fase C				
Dextran	100,00	1,00	1,00	1,00
Fase D				
Germaben® II	100,00	0,50	0,50	0,50
			100,00	100,00

[00346] Emulsão com base em goma xantana (controle 1): à temperatura ambiente, goma xantana e água (Fase A, Tabela 6) foram combinadas sob mistura propelente moderada até a homogeneidade. Polissorbato 80, mono-oleato de sorbitan e óleo mineral (Fase B, Tabela 6) foram

combinados em um pequeno recipiente e misturados manualmente até a homogeneidade. A Fase B foi lentamente adicionada à Fase A sob mistura propelente moderada. A mistura foi homogeneizada a 5000-9000 rpm por cerca de 5-10 minutos. Germaben® II (Fase C, Tabela 6) foi adicionado em seguida como conservante sob mistura propelente moderada.

**TABELA 6**

[00347] Emulsão com base em goma xantana:

Ingredientes	% Atividade	% em peso (desejado)	% em peso (puro)	Gramas
Fase A				
Água (deionizada)			74,00	74,00
Goma xantana	100,00	0,50	0,50	0,50
Fase B				
Polissorbato 80	100,00	2,43	2,43	2,43
Mono-oleato de sorbitan	100,00	2,57	2,57	2,57
Óleo mineral	100,00	20,00	20,00	20,00
Fase C				
Germaben® II	100,00	0,50	0,50	0,50
			100,00	100,00

[00348] Emulsão com base em Carbopol® Ultrez (controle 2): à temperatura ambiente, Carbopol® Ultrez 10 e água (Fase A, Tabela 7) foram combinados sob mistura propelente moderada até a homogeneidade. Polissorbato 80, mono-oleato de sorbitan e óleo mineral (Fase B, Tabela 7) foram combinados em um pequeno recipiente e misturados manualmente até a

homogeneidade. A Fase B foi lentamente adicionada à Fase A sob mistura propelente moderada. A mistura foi homogeneizada a 5000-9000 rpm por cerca de 5-10 minutos. Germaben® II (Fase C, Tabela 7) foi adicionado em seguida como conservante sob mistura propelente moderada. Utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio a 20% em peso para neutralizar a emulsão até pH 5,5.

**TABELA 7**

[00349] Emulsão com base em Carbopol® Ultrez 10:

Ingredientes	% Atividade	% em peso (desejado)	% em peso (puro)	Gramas
Fase A				
Água (deionizada)			74,00	74,00
Carbopol® Ultrez 10	100,00	0,50	0,50	0,50
Fase B				
Polissorbato 80	100,00	2,43	2,43	2,43
Mono-oleato de sorbitan	100,00	2,57	2,57	2,57
Óleo mineral	100,00	20,00	20,00	20,00
Fase C				
Germaben® II	100,00	0,50	0,50	0,50
			100,00	100,00

[00350] Análise da sensação na pele e resultados: realizou-se análise de sensação na pele dupla cega de acordo com ASTM E1490-3 (*Standard Practice for Descriptive Skinfeel Analysis of Creams and Lotions*, ASTM International, West Conshohocken PA, 2003, DOI: 10.1520/E1490-03, incorporado ao presente como referência) para comparar cada uma das emulsões acima. Os atributos primários avaliados neste estudo foram viscosidade de fricção, adesão posterior, quantidade de fibras na retirada e

adesão na retirada. Os participantes avaliaram os atributos em escala de 1 a 5, em que 1 exibe o menor atributo e 5 exibe o maior atributo. Os resultados são relatados na Tabela 8 abaixo como valor médio das avaliações dos participantes para cada atributo. A média da soma desses valores ( $\Sigma$ , Tabela 8) indica que a experiência sensorial geral para emulsões (por exemplo, loções) produzidas com dextrano conforme descrito no presente excede os resultados de emulsões similares produzidas com goma xantana ou Carbopol® Ultrez 10.

**TABELA 8**

[00351] Emulsão com base em Carbopol® Ultrez 10:

<b>Atributo de sensação na pele</b>	<b>Avaliação média</b>		
	<b>Dextrano</b>	<b>Goma xantana</b>	<b>Carbopol® Ultrez 10</b>
Viscosidade de fricção	2	3	2
Adesão posterior	2	2	3
Quantidade de fibras na retirada	1	3	3
Adesão na retirada	2	3	2
$\Sigma$	7	11	10

[00352] Vale a pena notar que a emulsão que contém dextrano apresentou avaliação melhor que as emulsões controle na análise de sensação na pele, especialmente porque havia duas vezes a quantidade de dextrano (1% em peso) na emulsão em comparação com a quantidade de goma xantana (0,5% em peso) ou Carbopol® Ultrez 10 (0,5% em peso) nas emulsões controle.

[00353] Dextrano produzido por gtf 0768 (que compreende SEQ ID Nº 1) pode, portanto, ser apropriado para uso em composições nas quais são desejáveis características sensoriais aprimoradas, tais como em produtos alimentícios e de cuidados pessoais.

**EXEMPLO 11**

[00354] Higienizador que compreende dextrano com partículas suspensas:

[00355] Este Exemplo descreve um higienizador que compreende o produto de dextrano de gtf 0768. Esferas de éster de jojoba puderam ser suspensas nessa composição, o que indica que dextrano pode funcionar como dispersante.

[00356] Dextrano foi produzido utilizando gtf 0768 (que compreende SEQ ID Nº 1) em reação similar à reação descrita no Exemplo 9. À temperatura ambiente, água, dextrano, glicerina, polissorbato 20, cocamidopropil betaína, PPG-2 hidroxietil cocamida e EDTA dissódico foram combinados de acordo com a formulação da Tabela 9 e misturados manualmente até a homogeneidade. Esferas de jojoba foram adicionadas em seguida e a mistura prosseguiu até a dispersão homogênea das esferas. O dextrano poderia haver sido opcionalmente hidratado previamente utilizando uma parte do componente de água.

**TABELA 9**

[00357] Suspensão de esferas de jojoba com base em dextrano:

<b>Ingrediente</b>	<b>% Atividade</b>	<b>% em peso (desejado)</b>	<b>% em peso (puro)</b>	<b>gramas</b>
Água (deionizada)			22,95	22,95
Dextrano	100	5	5	5
Glicerina	100	10	10	10
Polissorbato 20	100	5,25	5,25	5,25
Cocamidopropil betaína	35,97	20	55,6	55,6
PPG-2 Hidroxietil cocamida	100	1	1	1
EDTA dissódico	100	0,1	0,1	0,1

<b>Ingrediente</b>	<b>% Atividade</b>	<b>% em peso (desejado)</b>	<b>% em peso (puro)</b>	<b>gramas</b>
Esferas de éster de jojoba	100	0,1	0,1	0,1
			100	100

[00358] Dextrano produzido por gtf 0768 (que compreende SEQ ID Nº 1) pode, portanto, ser utilizado como dispersante em composições aquosas, tais como certos produtos de cuidados pessoais.

### **REIVINDICAÇÕES**

1. COMPOSIÇÃO, caracterizada por compreender dextrano, em que o mencionado dextrano compreende:

- (i) 87-93% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 6;
- (ii) 0,1-1,2% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 3;
- (iii) 0,1-0,7% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 4;
- (iv) 7,7-8,6% em peso de glicose ligada nas posições 1, 3 e 6; e
- (v) 0,4-1,7% em peso de glicose ligada nas:
  - (a) posições 1, 2 e 6; ou
  - (b) posições 1, 4 e 6;

em que o peso molecular ponderal médio (Mw) do mencionado dextrano é de 50-200 milhões de Daltons, e o raio médio z de giração do mencionado dextrano é de 200-280 nm.

2. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo dextrano compreender:

- (i) 89,5-90,5% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 6;
- (ii) 0,4-0,9% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 3;
- (iii) 0,3-0,5% em peso de glicose ligada nas posições 1 e 4;
- (iv) 8,0-8,3% em peso de glicose ligada nas posições 1, 3 e 6; e
- (v) 0,7-1,4% em peso de glicose ligada nas:
  - (a) posições 1, 2 e 6; ou
  - (b) posições 1, 4 e 6.

3. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo dextrano compreender cadeias ligadas entre si em uma estrutura de ramificação, em que o comprimento de pelo menos 70% das mencionadas cadeias está em mais/menos 15% do comprimento médio de todas as cadeias da estrutura de ramificação, e as cadeias compreendem pelo menos 98% de ligações alfa-1,6-glicosídicas.

4. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo comprimento médio das cadeias ser de 10-50 unidades monoméricas.

5. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela composição ser uma composição aquosa que possui viscosidade de pelo menos 25 cPs.

6. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo Mw do dextrano ser de 80-120 milhões de Daltons, e/ou o raio médio z de giração do mencionado dextrano ser de 230-250 nm.

7. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada por estar na forma de produto alimentício, produto de cuidados pessoais, produto farmacêutico, produto doméstico ou produto industrial.

8. MÉTODO DE AUMENTO DA VISCOSIDADE DE COMPOSIÇÕES AQUOSAS, caracterizado por compreender o contato do dextrano, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, com a composição aquosa, em que a viscosidade da composição aquosa é aumentada pelo mencionado dextrano em comparação com a viscosidade da composição aquosa antes da etapa de contato.

9. MÉTODO DE TRATAMENTO DE MATERIAL, caracterizado por compreender o contato de um material com uma composição aquosa que compreende o dextrano, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

10. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE DEXTRANO, caracterizado por compreender contatar pelo menos água, sacarose e uma enzima glicosiltransferase em uma reação livre de células, em que a enzima glicosiltransferase consiste em uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 2,

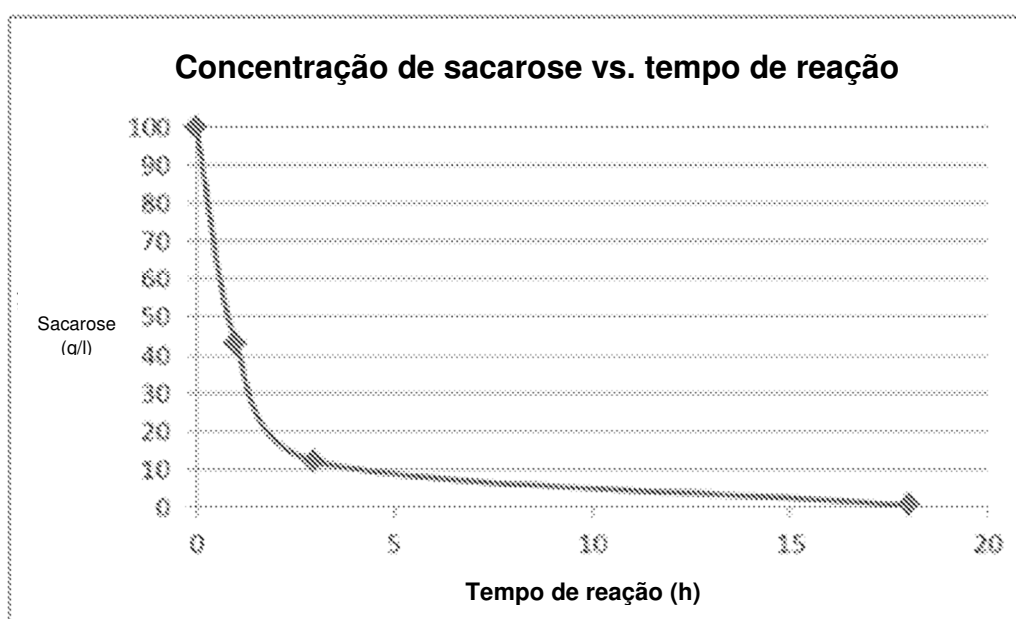


em que é produzido o dextrano, conforme definido na reivindicação

1.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por compreender adicionalmente o isolamento do dextrano produzido na reação.

12. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 11, caracterizado pela viscosidade do dextrano produzido no método aumentar com a redução da quantidade de sacarose na reação.

**FIG. 1**

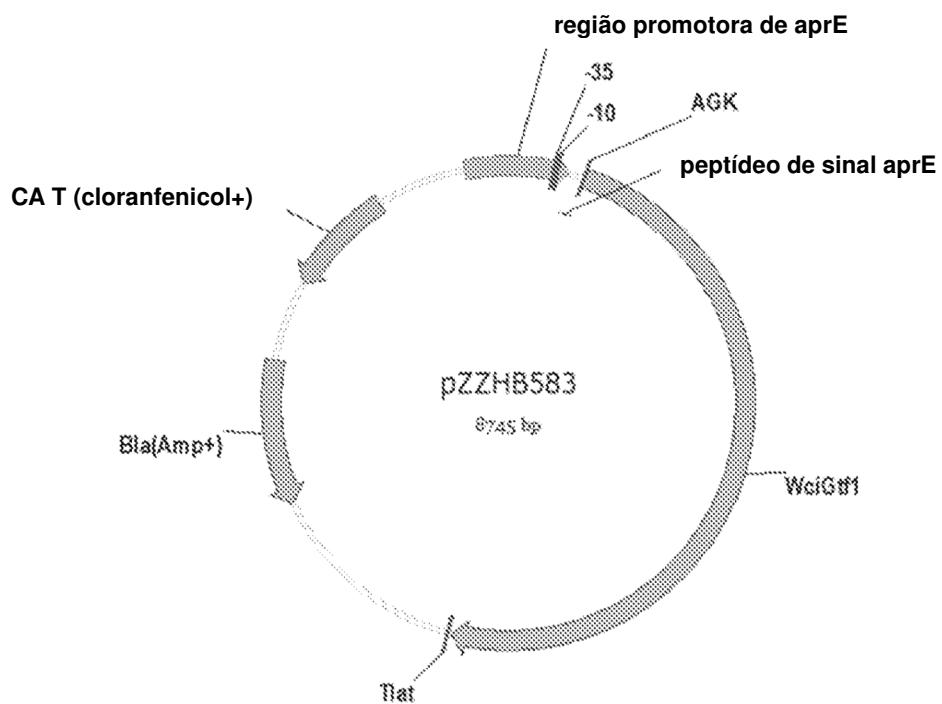


FIG. 2A

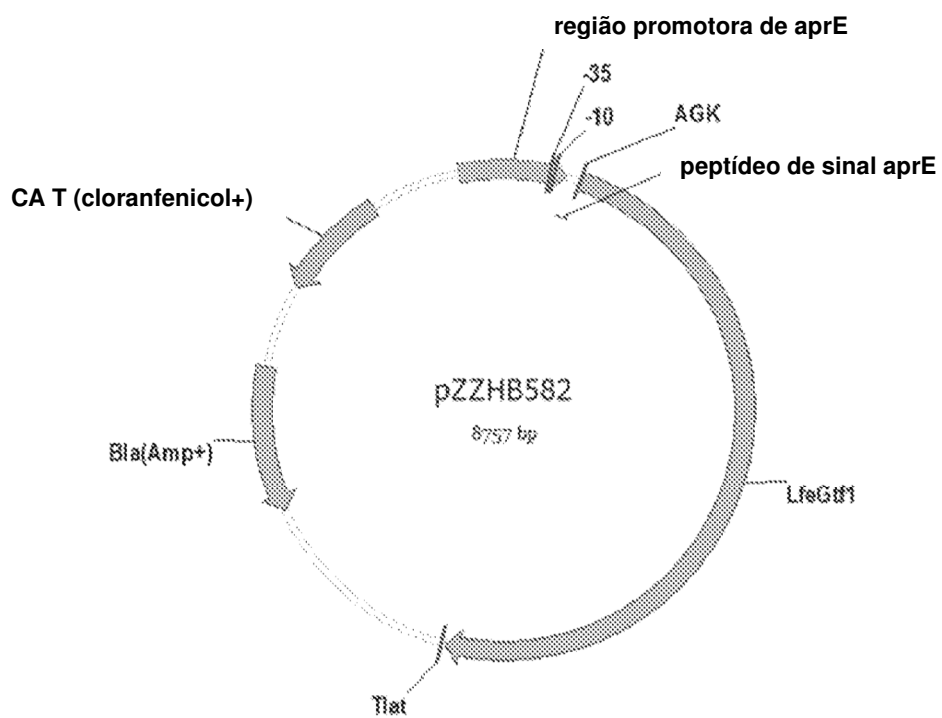


FIG. 2B

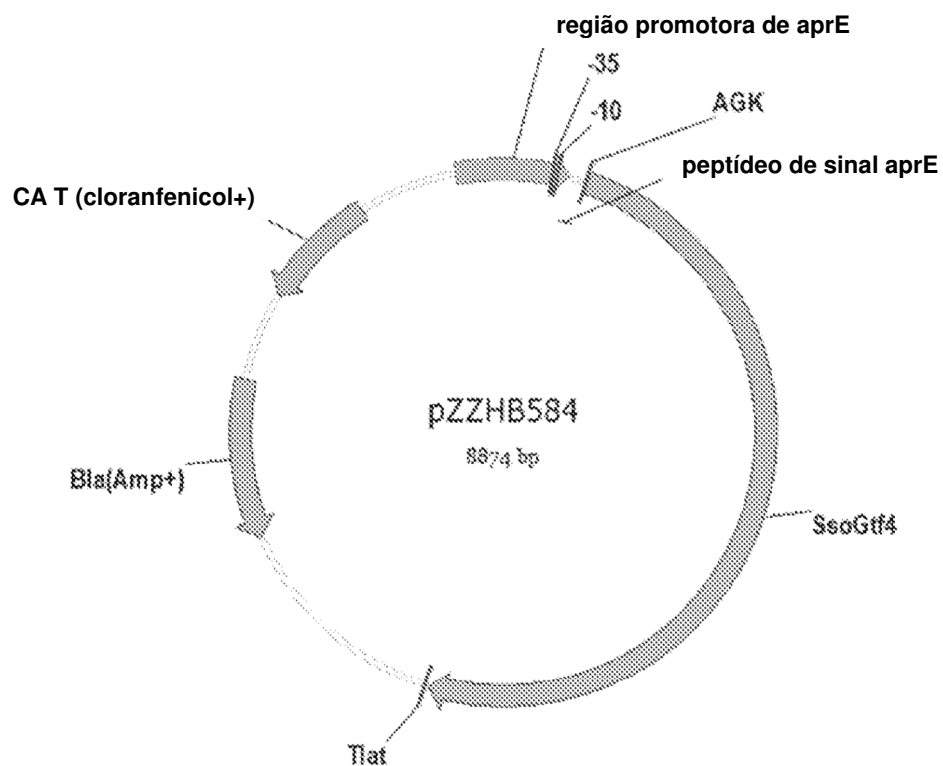


FIG. 2C

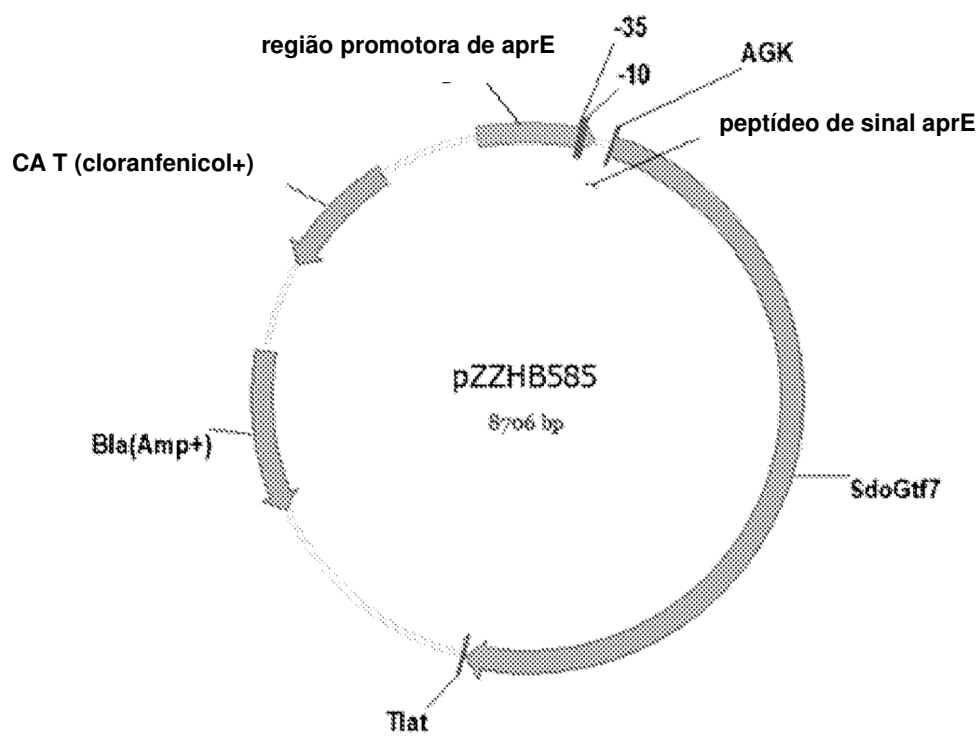


FIG. 2D

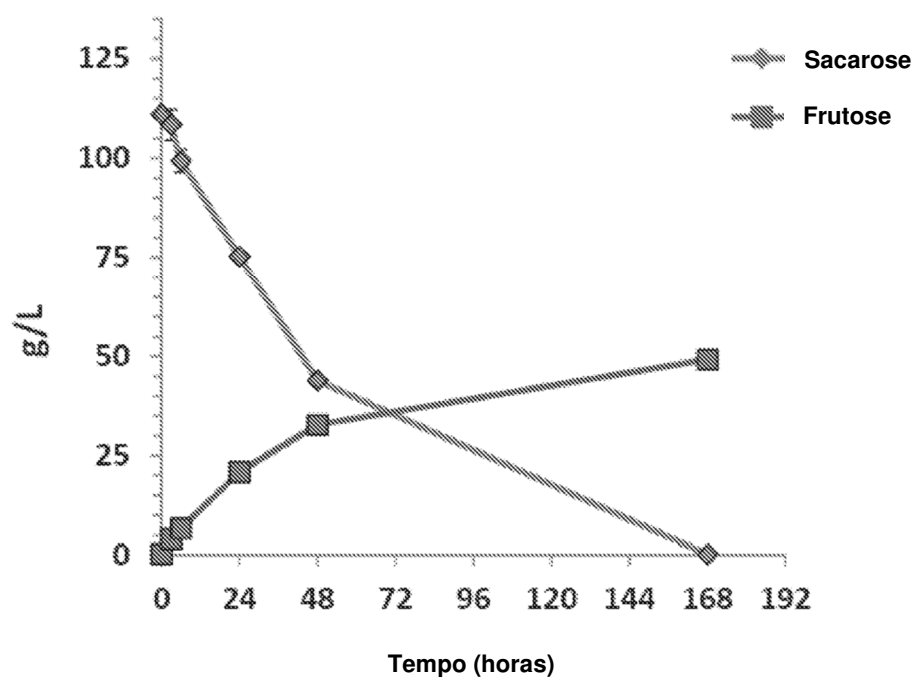


FIG. 3