



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

CARLOS ANDRÉ DOS SANTOS SILVA

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS A BASE DE
KEFIRANA PARA APLICAÇÃO COMO SUPORTE PARA CULTIVO CELULAR.**

Recife - PE

2015

CARLOS ANDRÉ DOS SANTOS SILVA

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS A BASE DE
KEFIRANA PARA APLICAÇÃO COMO SUPORTE PARA CULTIVO CELULAR.**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Biomédica, da Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia Biomédica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Yara

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Cláudia Sampaio de
Andrade Lima

RECIFE

2015

Catálogo na fonte
Bibliotecária Valdicea Alves. CRB-4 / 1260

S586p	Silva, Carlos André dos Santos. Preparação e caracterização de filmes poliméricos a base de kefirana para aplicação como suporte para cultivo celular / Carlos André dos Santos Silva. - Recife: O Autor, 2015. 99folhas, Il. Abr. e Tab. Orientador: Prof.º Dr. Ricardo Yara. Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação de Engenharia Biomédica, 2015. Inclui Referências. 1. Engenharia Biomédica. 2. Kefirana. 3. Carboidrato. 4. Filmes poliméricos. 5. Substitutos cutâneos. 6. Suporte para cultivo celular. I. Yara, Ricardo. (Orientador). II. Lima, Cláudia Sampaio de Andrade (Coordenadora).
	UFPE 610.28 CDD (22. ed.) BCTG/2015-222

CARLOS ANDRÉ DOS SANTOS SILVA

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS A BASE DE KEFIRANA PARA APLICAÇÃO COMO SUPORTE PARA CULTIVO CELULAR.

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Aprovado em: 20 de Fevereiro de 2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Yara, UFPE, Doutor pela Universidade de São Paulo – Piracicaba, Brasil. (Orientador).

Prof. Dr. Elmo Silvano de Araújo, UFPE, Doutor pela Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil. (Membro externo).

Profa. Dra. Adriana Fontes, UFPE, Doutora pela Universidade Estadual de Campinas – Campinas, Brasil. (Membro interno).

Coordenador do PPGEb: _____

Prof. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida e autor de meu destino, aos meus pais Carlos e Maria por todo apoio e sacrifício em minha educação, minha irmã Karla e minha noiva Livia pelo incentivo de nunca desistir frente aos problemas.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a **Deus**, que me mostrou que tudo posso naquele me dar forças para realizar tudo aquilo que ele já escolheu para mim.

Ao meu orientador **prof Ricardo Yara** que mesmo sem me conhecer, abriu as oportunidades de ingressar na vida acadêmica, e ter me ajudado a enfrentar este Golias que parecia ser impossível de vencer que foi este mestrado para mim. Como ele sempre diz, pesquisa é 99% feita de transpiração e agradeço por toda paciência e dedicação que teve ao longo dessa jornada. A minha orientadora **prof Cláudia Sampaio** pela oportunidade, não só no mestrado, mas no próximo passo que será o doutorado e por ter aberto as portas de sua vida, meu imenso agradecimento por tanta generosidade e ensinamentos que sempre serão lembrados e repassados como exemplo a ser seguido. Agradeço também à **prof Adriana Fontes**, à qual sempre admirei, e a **prof Beate Saegesser** por ambas terem me recebido tão bem em seu laboratório e sempre estarem dispostas a ajudar.

Aos meus pais **Carlos Pedro e Maria Cícera**, por não medirem esforços em me ajudar e dar uma educação à qual nunca tiveram oportunidade. Por todo apoio e preocupação ao aceitar que eu largasse meu emprego e saísse de casa para vir morar em outro estado onde não conhecia ninguém e nem tinha onde ficar. A cada telefonema diário de preocupação em saber do meu estado físico e mental, e todos os conselhos que precisei nos momentos mais angustiantes que passei. Por não me deixar desistir quando pensei em largar tudo para cuidar deles quando ficaram doentes, momentos esses que foram bem difíceis estando longe e querendo estar perto. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada. Obrigado minha irmã **Karla** por ter segurado a barra enquanto eu precisei estar em Recife, seu amor e carinho não serão esquecidos.

A minha noiva **Lívia Maria**, que me apoiou sempre na ideia de seguir esse caminho e soube me compreender nos momentos difíceis de angústia e variações de humor. Seu amor e companheirismo servirão de apoio para nosso crescimento no caminho da vida.

A **professora Graça** e todos do departamento de Bioquímica em especial para **Priscilla** que me auxiliaram no momento em que precisei bastante. Ao **professor Elmo Araújo** que abriu as portas de seu laboratório de Polímeros e Nanoestruturas no DEN e me auxiliou enriquecendo meu trabalho com sua enorme contribuição e toda a paciência, meu eterno obrigado. A **professora Márcia** e ao seu aluno **Arthur Alves** que contribuiu nas análises de cultura de células no laboratório de Radiobiologia, ainda tendo pouco tempo para defesa. Ao Departamento de Química e Física que contribuíram bastante auxiliando nos testes que precisei na busca em consolidar meu trabalho, muito obrigado a todos.

A todos os amigos do laboratório de **Biofísica Química – grupo NANOBIO/BIONAT**, por me receber de forma calorosa, me fazendo me sentir em casa, principalmente nos momentos de descontrações nas conversas loucas que todos entendiam. Em especial para **Natália** que foi uma amiga que me indicou para o **professor Ricardo**, sem ao menos conhecer-me antes e todos os ensinamentos e momentos juntos, obrigado. **Gilvânia** que foi uma amiga à qual sempre terei apreço não importa a distância ou momento em que estivermos, nunca esquecerei toda ajuda e conversa que tivemos ao longo desse mestrado. **Yago** meu eterno IC e amigo que sempre me ajudou principalmente nas trocas do kefir. **Dewson e Rafael** me ajudaram bastante principalmente nos testes de carboidratos, **Isabela, João Paulo, Paulo Euzébio, Lívia Linard**

e **Renan** pela amizade e por sempre estarem dispostos a me ajudar sendo com experimentos ou em uma conversa amiga e reconfortante. **Lenine** um abrigado especial por me ajudar com experimentos na física que precisei bastante. **Sr Fredson** obrigado pelas conversas e aquele sorriso de felicidade que sempre encontrava diariamente no laboratório ao senhor “*Good Morning and Thank you*”.

Aos meus incentivadores para seguir este caminho primeiro ao **professor José Maria** que me mostrou que esse era meu caminho, a **professora Laura Pinotti** que foi minha primeira orientadora e me mostrou o sentido de fazer pesquisa juntamente com meus amigos **Chris e Erikson**. A minha eterna e amada **professora Maíza Bezerra** que foi minha mestra e sempre me incentivou neste caminho a qual devo eternamente um belíssimo obrigado por tudo que fez pela minha pessoa enquanto estivemos junto na jornada do meu TCC e no estágio no **HEMOAL**, jamais me esquecerei pelo que fez por mim. A **Dra. Válnia** pela oportunidade de trabalhar junto dela em seu laboratório e ter conhecido esse ser humano que sempre me ajudou e me moldou para a vida. **Vâninha** e a todos do laboratório, jamais esquecerei de vocês.

Aos meus familiares que sempre acreditaram em meu potencial e investiram em mim. Aos meus amigos da igreja, pois foi nesse meio que aprendi o valor da minha fé. Foi onde aprendi a refletir e duvidar e nunca encarar a realidade como pronta. Aqui aprendi a ver a vida de um jeito diferente.

Aos meus amigos e colegas do curso de mestrado **Gil, Bia, Max, Erika, Sandra, Isabela, Camila, Charles, Jorge, Daniel e Antônio**, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhoram tudo o que tenho produzido na vida. Em especial para meus amigos de forrageira **Wendell e Allan**, com certeza vocês me proporcionaram momentos felizes principalmente em meus momentos de solidão longe daqueles que sempre estavam perto de mim.

Aos meus primos **Alan, Deywid** e é claro **Edson Godoi**, com vocês aprendi o significado da palavra família.

Aos professores e funcionários do **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica**, pela ajuda e companheirismo. O inesquecível **Jeová Borges**, a quem a turma sempre lembrará.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A kefirana, um exopolissacarídeo produzido por micro-organismos presentes nos grãos kefir e é constituído por uma glicogalactana que possui várias propriedades benéficas para a saúde. No presente trabalho foram desenvolvidos filmes poliméricos baseados em kefirana para constituir suportes para o cultivo celular. Inicialmente foram desenvolvidos vários métodos de extração da kefirana. Para o primeiro método foi utilizado uma solução de hidróxido de sódio 1 M como solvente de extração, denominado de T1. No segundo método, os grãos passaram por um processo de cozimento em água destilada onde foram separados os sobrenadante e precipitado, que foram analisados de forma independente, depois de serem cozidos em hidróxido de sódio. O sobrenadante foi denominado T2 e o precipitado, T3. Para obtenção de T4, os grãos foram submetidos a uma precipitação seriada, utilizando-se soluções de etanol, com concentrações diferentes. No quinto método utilizou-se água como solvente no processo de extração, chamado de T5. Foram selecionados os métodos T2 e T4 baseados na reprodutibilidade dos filmes formulados. Os filmes foram caracterizados através de análises morfológicas, físicas, espectroscópicas e de aderência celular. Os filmes foram analisados macroscopicamente e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e apresentaram-se uniformes em sem rachaduras. Também foi avaliada a influência da irradiação gama para tanto foram irradiados kefiranas nas seguintes doses: 15, 25 e 50 kGy. Macroscopicamente, os filmes também se mostraram flexíveis. A técnica T4 obteve melhores resultados com menor espessura ($0,03 \pm 0,015$ mm), maior teor de umidade ($55,17 \% \pm 0,445$), transparência ($84,09 \% \pm 0,51$), tensão de ruptura ($4,89 \text{ MPa} \pm 0,06$), alongamento de ruptura ($111,99 \% \pm 0,35$) e rendimento global ($4,28 \%$), porém T2 obteve um maior teor de carboidrato ($52,31 \% \pm 0,03$) em relação a T4 ($46,38 \% \pm 0,03$). Através do ângulo de contato foi possível observar que a superfície dos filmes T2 e T4 era hidrofílica. Nas análises de Difração de Raios X (DRX) foi possível verificar o comportamento amorfo do polímero em ambos os métodos de extração. A natureza química do material foi confirmada por FTIR, sendo os dois filmes apresentando picos semelhantes como encontrado nos filmes de kefirana descritos na literatura. Nas análises viscosimétricas foi possível observar através do método de Huggins que a kefirana, assim como a maioria dos polímeros obedece a uma relação linear com $K_H \sim 3,8$. A irradiação gama na kefirana, provocou os efeitos de reticulações e cisões na cadeia principal dependendo da dose irradiada, tendo a dose de 15 kGy um maior número de reticulação do que cisões. O teste de adesão celular em que células mesenquimais de cordão umbilical foram cultivadas sobre a superfície do polímero, observou-se que houve uma adesão parcial em ambos os filmes não indicando toxicidade nem decomposição do polímero.

Palavras-chaves: Kefirana, carboidrato, filmes poliméricos, suporte para cultivo celular.

ABSTRACT

The kefir is an exopolysaccharide produced by micro-organisms present in the kefir grains and consists of a glycolgalactan which has various properties beneficial to health. In this work were developed polymeric films based on kefirana to constitute supports for cell culture. Initially they were developed several methods of extraction kefirana. For the first method used was a sodium hydroxide solution 1 M as the extraction solvent, called T1. In the second method, the grains have undergone a baking process in which the distilled water supernatant and precipitate were separated, they were analyzed independently, after being boiled in sodium hydroxide. The supernatant was and the precipitate called T2, T3. To obtain T4, the grains were subjected to a serial precipitation using ethanol solutions with different concentrations. In the fifth method we have used water as the solvent in the extraction process, called T5. T2 and T4 methods based on reproducible formulated films were selected. The films were characterized by morphological, physical, spectroscopic analysis and cell adhesion. The films were analyzed macroscopically and by scanning electron microscopy (SEM) and showed up in uniform without cracks. It also evaluated the influence of gamma irradiation for both were irradiated kefirana in the following doses: 15, 25 and 50 kGy. Macroscopically, the films also proved flexible. The T4 technique achieved better results with less thickness (0.03 ± 0.015 mm), higher moisture content ($55.17\% \pm 0.445$), transparency ($84.09\% \pm 0.51$), breakdown voltage (4.89 ± 0.06 MPa), breaking elongation ($111.99\% \pm 0.35$) and comprehensive income (4.28%), although T2 obtained a higher carbohydrate content ($52.31\% \pm 0.03$) compared T4 ($46.38 \pm 0.03\%$). Through the contact angle was observed that the surface of the films T2 and T4 was hydrophilic. In the analysis of X-Ray Diffraction (XRD) it observed the behavior of amorphous polymer in both extraction methods. The chemical nature of the material was confirmed by FTIR, and the two films having similar peaks as found in others kefirana films. In viscosimetric analysis was observed by Huggins method that kefirana, as most polymers obeys a linear relationship with $KH \sim 3.8$. Gamma irradiation at kefirana caused the effects of crosslinking and divisions in the main chain depending on the irradiated dose, and a dose of 15 kGy a greater number of crosslinking than divisions. The cell adhesion assay in which umbilical mesenchymal cells were cultured on the polymer surface, it was observed that there was a partial membership in both films indicates no toxicity and no decomposition of the polymer.

Keywords: Kefirana, carbohydrate, polymer films, scaffold for cell culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Utilização dos biomateriais em diversas partes no corpo humano	14
Figura 2-	Relação meros-polímeros. Constituição básica do polímero polietileno	17
Figura 3-	Grãos de kefir cultivados utilizando como substrato açúcar mascavo	19
Figura 4-	Fórmula estrutural da kefirana	20
Figura 5-	Tríade da engenharia de tecidos	30
Figura 6-	Fluxograma do método de cultivo dos grãos de kefir	31
Figura 7	Fluxograma para extração de kefirana pelo método descrito por Moreira et al. (2008) –Método T5	32
Figura 8-	Fluxograma para extração de kefirana pelo método descrito por Onofre (2014) – Método T1	33
Figura 9-	Fluxograma para extração de kefirana pelos métodos denominados T2 e T3 desenvolvidos neste trabalho	35
Figura 10-	Fluxograma de extração da kefirana descrito ALBUQUERQUE et al., (2014) (método T4)	36
Figura 11-	Fluxograma da metodologia de desenvolvimento de filmes poliméricos	38
Figura 12-	DRX modelo XRD700 da Shimadzu	39
Figura 13-	MEV do DF-UFPE. Modelo JSM 5900 – JOEL	42
Figura 14-	Gráfico de rendimento dos processos de extração de kefirana	42
Figura 15-	Curva padrão da glicose (mg/mL)	47
Figura 16-	Filmes de kefirana, pelos métodos T2 (A) e T4 (B)	49
Figura 17-	Difratometria de raios X da Kefirana	50
Figura 18-	Gráfico do FTIR dos filmes pelo método 1 e 2 e simultâneo	51
Figura 19-	Transparência dos filmes de kefirana nos métodos de extração T2 e T4	53
Figura 20-	Perfis das gotas da água nos filmes T2 e T4, obtidos através do goniômetro	56
Figura 21-	Imagens de MEV dos filmes de kefirana dos métodos T2 e T4	58
Figura 22-	Ensaio de correlação utilizado para o cálculo da constante de Huggins kefirana extraída do método T4 em solvente NaOH	59
Figura 23-	Ensaio de correlação utilizado para o cálculo da constante de Huggins com kefirana extraída do método T4 em água	60
Figura 24-	Efeito da radiação gama sobre a viscosidade intrínseca de kefirana dissolvida obtida pelo método T4	61
Figura 25-	Microfotografia das células tronco mesenquimais em cultura nos filmes T2 e T4	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores de carboidratos solúveis (mg g^{-1}) totais da kefirana e seus respectivos rendimento global	48
Tabela 2 FTIR janelas espectrais e atribuições às bandas	52
Tabela 3 Resultados da espessura dos filmes de kefirana dos métodos de extração 1 e 2	52
Tabela 4 Transparência dos filmes de kefirana dos métodos de extração T2 e T4	53
Tabela 5 Teor de umidade dos filmes de kefirana dos métodos de extração 1 e 2	54
Tabela 6 Tensão de ruptura e deformação de ruptura dos filmes	56

LISTA DE ABREVIATURAS

DRX	Difração de Raios X
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
LEB	Laboratório de Engenharia Biomédica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
ECM	Matriz extracelular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
RH	Hidrolisado de arroz
RCE	Reação de corpo estranho
IgG	Imunoglobulina G
NaOH	Hidróxido de Sódio
HCl	Ácido Clorídrico
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
Mi	Massa inicial
Mf	Massa final
KOH	Hidróxido de Potássio
Na	Sódio
K	Potássio
MMT	Montmorilonita
K _H	Constante de Huggins
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TGA	Análise Termogravimétrica
DTA	Análise térmica diferencial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	13
2.1 Geral	13
2.2 Específico	13
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1 BIOMATERIAIS	14
3.2 POLÍMEROS	16
3.3 KEFIRANA	18
3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DOS SUPORTES	21
3.5 ANÁLISES REOLÓGICAS	22
3.6 BIOCOMPATIBILIDADE DE UM BIOMATERIAL	23
3.6.1 INFLAMAÇÃO E RESPOSTA AO CORPO ESTRANHO	24
3.6.2 TECIDO GRANULOSO	26
3.6.3 REAÇÃO CORPO ESTRANHO	26
3.6.4 ENCAPSULAMENTO FIBROSO	27
3.7 ENGENHARIA DE TECIDOS	28
4 METODOLOGIA	31
4.1 PRODUÇÃO DO KEFIR	31
4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA KEFIRANA	32
4.2.1 MÉTODO DE EXTRAÇÃO 1 (T1)	33
4.2.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO 2 E 3 (T2 E T3)	34
4.2.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO 4 (T4)	36
4.3 ESTIMATIVA DO TOTAL DE CARBOIDRATO	37
4.4 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS	37
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS	39
4.5.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	39
4.5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DA KEFIRANA	39

4.5.3 ESPESSURA	40
4.5.4 TRANSPARÊNCIA	40
4.5.5 TEOR DE UMIDADE	40
4.5.6 ÂNGULO DE CONTATO	41
4.5.7 RESISTÊNCIA À TRAÇÃO	41
4.5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	41
4.5.9 ANÁLISES VISCOSIMÉTRICAS	42
4.5.10 AVALIAÇÃO DOS FILMES DE KEFIRANA PARA CULTIVO CELULAR	43
4.5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
6 CONCLUSÃO	64
7 PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa em biomateriais tem sido destinada em aplicações biomédicas para desenvolver mais materiais que podem ser usados para restaurar ou renovar a função de tecidos doentes traumatizados no corpo humano e, assim, melhorar a qualidade de vida (GARRIC et al., 2012).

Em aplicações biomédicas, os critérios para a seleção de novos biomateriais são baseados na sua constituição química, peso molecular, solubilidade, forma e estrutura, hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, a lubrificidade, a energia de superfície, a degradação de absorção de água, e um mecanismo de erosão.

A engenharia de tecidos visa utilizar biomateriais para restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos que estão com defeito ou que tenham sido perdidos por diferentes condições patológicas, quer através do desenvolvimento de substitutos biológicos ou tecidos reconstruindo, tendo os suportes (Scaffolds) papel único na regeneração dos tecidos e reparação (LANZA, LANGER, VACANTI, 2011).

Durante as últimas décadas, muitos trabalhos têm sido realizados para desenvolver materiais para servir de suporte com potencial aplicável para engenharia de tecidos. Os suportes são biomateriais porosos concebidos para realizar alguma ou todas as seguintes funções: (a) promover interações das células-biomaterial, adesão celular, e a deposição de matriz extracelular (ECM), (b) permitir o transporte suficiente de gases, nutrientes, e regulamentar fatores para permitir a sobrevivência celular, a proliferação e diferenciação, (c) biodegradar-se a uma velocidade controlável que se aproxime da taxa de regeneração de tecidos sob as condições de cultura de interesse, e (d) provocar um grau mínimo de inflamação ou toxicidade *in vivo* (LANGER, TIRRELL, 2004).

A kefirana polímero natural é um exopolissacarídeo microbiano obtido a partir da microbiota do kefir, ela contém glicose e galactose sendo solúvel em água (PIERMARIA, et al., 2009). Ela também pode formar géis com propriedades viscoelásticas em baixas temperaturas (PIERMARIA, DE LA CANAL, ABRAHAM, 2008). Além disso, em comparação com outros polissacáridos, a kefirana possui várias vantagens importantes relatadas, tais como propriedades a imunomodulação ou a proteção do epitélio (MAEDA, et al., 2004).

A necessidade de soluções alternativas para atender a demanda por novos materiais deverá impulsionar os avanços na engenharia de tecidos. Neste sentido, suportes poliméricos tem o potencial para fornecer um novo meio para controlar o ambiente físico e químico do

sistema biológico. Apesar das recentes melhorias para as propriedades mecânicas, porosidade e bioatividade dos suportes, futuras pesquisas são necessárias para superar muitas limitações dos materiais existentes atualmente. A engenharia de tecidos necessita de uma vasta gama de materiais para suprir várias aplicações e superar os desafios globais em projetos e produção de suportes.

Este estudo pretende estabelecer uma nova técnica de produção de filmes de kefirana que possam ser aplicados como suporte para crescimento celular.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver filmes poliméricos baseados em kefirana para serem utilizados como suporte para cultivo celular.

2.2 Específicos

- Desenvolver novos métodos de extração da kefirana
- Elaborar filmes a partir da kefirana;
- Realizar a caracterização física dos filmes obtidos;
- Realizar a caracterização físico-química e espectroscópica dos filmes obtidos;
- Avaliar o efeito da radiação ionizante no polímero;
- Avaliar a capacidade de aderência de células mesenquimais nos filmes de kefirana;

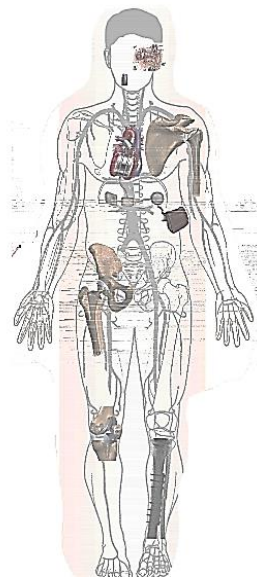
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. BIOMATERIAIS

O termo Biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde como “Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser utilizada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (RODRIGUES, 2012).

A área abrangente dos biomateriais é multidisciplinar, e o projeto para a elaboração de um novo biomaterial requer uma interação sinérgica de diversas áreas de conhecimento como física, química, biologia e medicina. Diferentes tipos de biomateriais como os metais e ligas metálicas são amplamente utilizados em ortopedia e odontologia (PARK, BRONZINO, 2003). As cerâmicas são utilizadas na área de saúde, ou pela sua natureza química inerte ou pela sua bioatividade (HENCH, 1998). Os polímeros são utilizados para a substituição de tecidos moles ou em substituição de tecidos danificados (Figura 1). Para alcançar melhores propriedades biológicas e resistência mecânica, compósitos, metais, cerâmicas e polímeros devem ser clinicamente avaliados. Em termos gerais, todos os biomateriais estão sendo desenvolvidos para manter o equilíbrio entre as propriedades mecânicas dos tecidos substituídos e os efeitos biológicos do material sobre o tecido.

Figura 1: Utilização dos biomateriais em diversas partes no corpo humano.



Fonte: NECULA et al., 2009

A investigação e desenvolvimento de biomateriais têm sido caracterizados por uma evolução lógica da biologia celular e molecular, engenharia e ciências dos materiais e um entendimento das interações dos materiais com o ambiente fisiológico. Estes desenvolvimentos permitiram a evolução dos conceitos de interações tecido-biomateriais para evoluir através de três etapas, sobrepondo ao longo do tempo, no entanto, cada um com um objetivo bem diferente (HENCH, POLLAK, 2002).

A "primeira geração" de biomateriais modernos (elaborados em meados do século 20) disponível no mercado, não foram desenvolvidos especificamente para a sua utilização médica prevista. Eles foram escolhidos devido a uma combinação desejável de propriedades físicas específicas para o uso clínico, e se destinavam a serem bioinertes (ou seja, capazes de promover uma resposta mínima dos tecidos do hospedeiro). O carbono pirolítico, originalmente desenvolvido na década de 1960 como um material de revestimento reservatórios de combustíveis nucleares, é agora amplamente utilizado para revestir próteses de válvulas cardíacas mecânicas. Este composto exemplifica um dos primeiros biomateriais cuja formulação foi estudada, modificada e controlada de acordo com os princípios da biologia e da engenharia, especificamente para aplicação médica (BOKROS, 1977).

Posteriormente, foram desenvolvidas tecnologias para a produção de novos biomateriais, para que estes apresentassem interações químicas e bioquímicas com o organismo, sendo denominados biomateriais de "segunda geração". Estes foram destinados a provocar reações específicas, a fim de induzir a vantagem terapêutica desejada.

Na década de 1980, os materiais bioativos já eram utilizados na clínica em cirurgias ortopédicas e odontológicas, como várias composições de vidros bioativos e cerâmicas (HENCH, POLLAK, 2002). Um exemplo de sucesso foi a elaboração de vidros bioativos que precipitam hidroxiapatita em implantes ósseos (NARAYAN, 2010).

A segunda geração de biomateriais também incluiu o desenvolvimento de biomateriais absorvíveis, como é o caso de alguns tipos de polímeros com taxas variáveis de degradação e reabsorção, combinados com os requisitos de uma aplicação desejada. Assim, a interface entre local do implante e o tecido hospedeiro poderia ser eliminada, a longo prazo, porque o material estranho seria, em última análise, reabsorvido pelo hospedeiro e substituído pelo tecido normal. Muitos grupos continuam trabalhando para a elaboração de novos polímeros biodegradáveis, que tenham características ideais para o desenvolvimento de tecidos artificiais biocompatíveis, ou seja, que possam associar força mecânica, flexibilidade, e composição química (HUBBELL, 1999; GRIFFITH, 2000; LANGER, 1999).

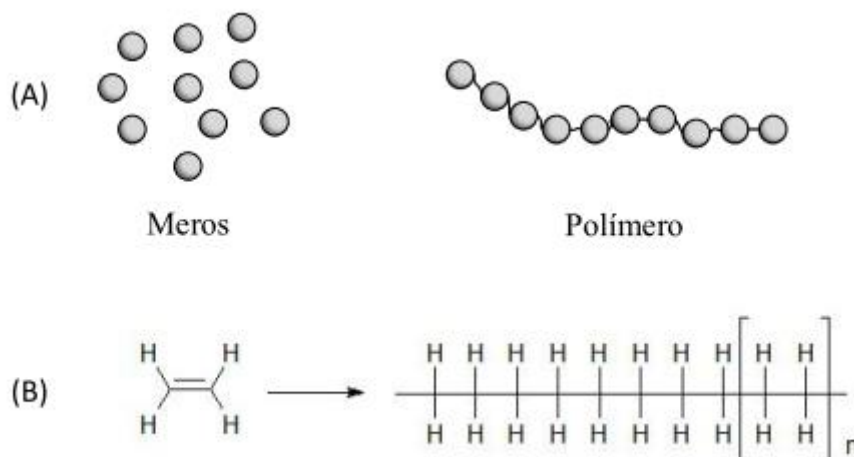
Com superfícies de engenharia e arquitetura em massa sob medida para específicas aplicações, biomateriais de "terceira geração" destinam-se a estimular reações altamente precisas, com proteínas e células, a nível molecular. Esses materiais utilizam o conhecimento das interações moleculares para desenvolver os suportes que podem ser empregados no cultivo de células *in vitro* para posterior implantação ou especificamente para atraírem células funcionais endógenos *in vivo*.

A transição de biomateriais de segunda a terceira geração é exemplificada pelos avanços na liberação controlada de fármacos ou outras moléculas biologicamente ativas. O desenvolvimento de sistemas micro e a nanotecnologia abriram novas possibilidades de controle para definir o comportamento das células através de manipulação química de superfície e das propriedades mecânicas (CHEN et al., 1997; BHATIA et al., 1999; HUANG, INGBER, 2000; CHIU et al., 2003).

3.2 POLÍMEROS

Polímeros são substâncias compostas de moléculas caracterizadas pela múltipla repetição de uma ou mais espécie de átomos ou grupos de átomos (unidades constitucionais) ligados entre si em quantidades suficientes para fornecer um conjunto de propriedades que não variam notavelmente com a adição ou remoção de uma ou de algumas (poucas) das unidades constitucionais, podendo ser obtido de forma sintética ou natural (PAOLI, 2009). Figura 2.

Figura 2: (A) Relação meros-polímeros (B) Constituição básica do polímero polietileno.



Fonte: ONOFRE (2014).

São biomateriais vastamente utilizados nas áreas ortopédicas, odontológicas, cardiovascular e de engenharia de tecidos. Podem ser orgânicos ou inorgânicos, apresentando alto peso molecular. Polímeros orgânicos são constituídos basicamente de átomos de carbono e hidrogênio ligados entre si por ligações covalentes, apresentando características como baixa densidade, pequena resistência à temperatura, baixas condutividades elétrica e térmica (ORÉFICE, PEREIRA, MANSUR, 2006). Polímeros inorgânicos não possuem necessariamente átomos de carbono em sua cadeia principal, podendo esta ser constituída de silício, fósforo, oxigênio, entre outros (MARK, ALLCOCK, WEST, 2005).

Os polímeros são amplamente utilizados em várias bioaplicações, porque estão disponíveis em uma variedade de composições, propriedades, formas (sólidos, fibras, tecidos, películas, e géis), e podem constituir formas e estruturas complexas (RAMAKRISHNA et al., 2001). Nos últimos anos, houve um notável crescimento na pesquisa e desenvolvimento de polímeros para a engenharia biomédica, microeletrônica e outras aplicações tecnológicas avançadas. Polímeros sensíveis à temperatura ganharam muita atenção devido ao seu comportamento inteligente e reversível em resposta a estímulos ambientais, em particular, à variação de temperatura. Tal comportamento é de grande importância para a investigação teórica e básica, pois estes materiais podem ser utilizados para formar os materiais inteligentes, com dimensões micro ou nano, e podem apresentar-se como géis, partículas, micelas e cápsulas (BUCIO, BURILLO, 2007).

As propriedades dos polímeros dependem da composição, estrutura e arranjo das suas macromoléculas constituintes. Ele pode ser categorizado em diferentes tipos em termos da sua estrutural, química e as características biológicas. Polímeros produzidos naturalmente, sintéticos biodegradáveis, e polímeros sintéticos não biodegradáveis são os principais tipos de polímeros utilizados como biomateriais. Os polímeros naturais podem ser considerados como os primeiros biomateriais biodegradáveis utilizados clinicamente (MWALE et al., 2006).

Materiais naturais, devido às propriedades bioativas têm melhores interações com as células que lhes permitam melhorar o desempenho das células no sistema biológico. Os polímeros naturais podem ser classificados como proteínas (seda, colágeno, gelatina, fibrinogênio, elastina, queratina, actina, miosina), polissacarídeos (celulose, amilose, dextrano, quitina, e glicosaminoglicanos) ou polinucleótidos (DNA, RNA) (ZRINYI, 2000).

A ampla utilização de materiais poliméricos como biomateriais é fruto da flexibilidade dos polímeros em serem projetados a partir da organização da sua estrutura macromolecular e exibirem comportamentos específicos relevantes para cada aplicação. Os polímeros utilizados como biomateriais são chamados biopolímeros (ORÉFICE, PEREIRA, MANSUR, 2006).

3.3 KEFIRANA

Originário das montanhas do Cáucaso, o kefir é uma suspensão de microrganismos simbioses, formados por bactérias, predominantemente ácido-lácticas e leveduras. Os grãos de kefir são compostos adicionalmente por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*), não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces amnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.* e *Streptococcus salivaris subsp. thermophilus* (BRASIL, 2007). A composição microbiológica do kefir sofre variação com a origem dos grãos e com o método e substrato utilizados para o cultivo (GARROTE, ABRAHAM, DE ANTONI, 2001).

Seu produto fermentado resulta numa solução ácida contendo compostos aromáticos, gás carbônico e etanol (DINIZ et al., 2003). Este consórcio microbiano é envolvido por uma matriz de polissacarídeos secretados por algumas bactérias, conhecidos como kefirana. Apresentam-se macroscopicamente como grãos gelatinosos, de forma irregular e tamanhos variados entre 3 a 20 mm (Figura 3). MOREIRA et al., (2008), descreveu a atividade antiinflamatória do biopolímero produzido a partir do Kefir.

Figura 3: Grãos de kefir cultivados utilizando como substrato açúcar mascavo.



A kefirana é um polissacarídeo microbiano obtido a partir da flora do kefir. É comumente encontrado e é cada vez mais, utilizado na indústria de alimentos para texturização de alimentos e como agente de gelificação. É um polissacarídeo solúvel em água, contendo quantidades aproximadamente iguais de glicose e galactose (PIERMARIA et al., 2009). Estudos recentes têm relatado que este exopolissacárido pode ser isolado a partir dos grãos cultivados em leite ou açúcar mascavo (RIMADA, ABRAHAM, 2006; ONOFRE, 2014).

A kefirana possui propriedades funcionais, tais como estimulante do sistema imunológico e atividade antimutagênica (GUZEL-SEYD, KOK-TAS, 2011), e recentemente atraiu tanto interesse como um polímero biodegradável para recobrir alimentos (GHASEMLOU et al., 2011; PIERMARIA et al., 2009; MOTEDAYEN, KHODAIYAN, SALEHI, 2013). Figura 4.

MAEDA et al. (2004), analisou os efeitos da kefirana sobre os lipídios, pressão arterial, glicemia, e prisão de ventre. Neste estudo, foi desenvolvido um novo meio, hidrolisado de arroz (RH) médio, para a cultura de kefir. A análise estrutural revelou que a kefirna produzida era composta de uma unidade de repetição de hexassacáridos, essencialmente idêntico a relatada em estudos anteriores. Um estudo sobre os efeitos da kefirana demonstraram que ela suprimiu significativamente o aumento da pressão arterial e reduziu os níveis de colesterol sérico e reduzir a glicemia em ratos. Além disso, a administração de kefir causou uma melhora substancial nos níveis de umidade fecal e peso úmido de fezes. Estes resultados sugerem que kefirana poderia ser utilizado como um alimento funcional para prevenir algumas doenças que ocorrem vulgarmente.

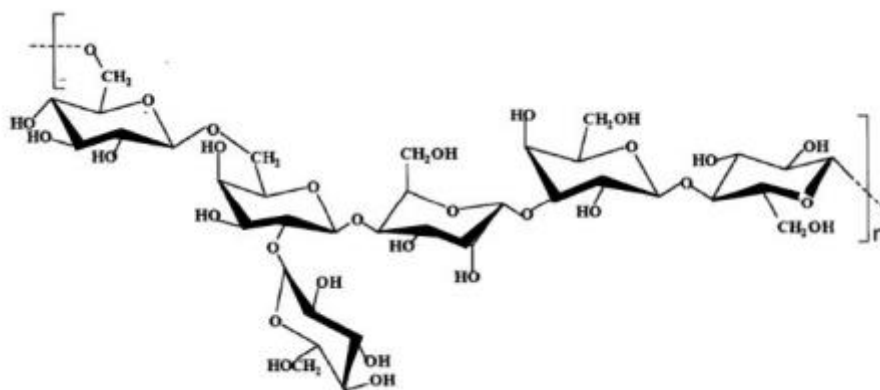
MOREIRA et al., (2008), avaliou a propriedade anti-inflamatória de uma fração do carboidrato isolado do kefir em açúcar. A atividade anti-inflamatória da fração isolada de

hidratos de carbono foi testado tanto *in vitro* (respirometria celular e cultura de macrófagos) e *in vivo* (edema de pata, permeabilidade vascular, e propriedade cicatrizante). Os resultados indicaram que não houve diferença significativa para o consumo de oxigênio ou cultura de macrófagos entre os grupos controle e teste. Os dados globais sugeriram que o kefir pode ser utilizado como um constituinte de um composto anti-inflamatório potente. Ainda neste trabalho foi apresentada uma técnica de extração do polímero utilizando-se como solvente, a água (Figura 4).

No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre as suas características como filme (PIERMARIA et al., 2011).

Depois de apresentar a kefirana como agente filmogênico, novos estudos têm investigado modificações para este biopolímero, como a adição de plastificantes (GHASEMLOU et al., 2011a; PIERMARIA et al., 2011) ou determinar a sua composição com outros polissacarídeos (MOTEDAYEN, KHODAIYAN, SALEHI, 2013).

Figura 4: Fórmula estrutural da kefirana



Fonte: VU et al., 2009.

Filmes de kefirana são capazes de se degradarem biologicamente e possuem propriedades comparáveis aos dos plásticos à base de petróleo. Por estas razões, as pesquisas sobre biopolímeros têm recentemente focado em melhorar suas propriedades mecânicas e, conseqüentemente, podendo ser amplamente utilizado para várias aplicações (AVELLA et al., 2005).

PIERMARIA et al., (2009), analisou a capacidade da kefirana de formar filmes e o efeito da adição de glicerol em diferentes concentrações e as propriedades do filme foram avaliadas. Kefirana foi capaz de formar filmes em concentrações diferentes. Todas as soluções de formação de filme exibiram um comportamento pseudo-plástico, além do glicerol não

modificar as soluções nas propriedades reológicas. Os filmes exibiram características de solubilidade diferencial, nas diferentes temperaturas ensaiadas e com boas propriedades de vapor de água e ao glicerol. Filmes sem glicerol foram frágeis e rígidos, uma vez que apresentou módulo de elasticidade elevados e os valores de resistência à tração baixo. Adição de glicerol conduziram a valores extremamente elevados de alongamento, permitindo flexibilidade comparáveis às dos materiais sintéticos. Além disso, PIERMARIA, DE LA CANAL, ABRAHAM (2008) extraíndo a kefirina utilizando água como solvente, analisaram cromatogramas de permeação de gel que revelou uma única distribuição de massa molar correspondente a 10^7 u neste estudo a viscosidade intrínseca da kefirana foi determinada utilizando extrapolações Huggins, de $K_H \sim 6,0$ dl/g e usando aproximações Kramer, apresentou 5,95 dl/g. Estes resultados mostram que a kefirana possui um comportamento newtoniano em soluções diluídas, o que o torna um pseudoplástico em concentrações mais elevadas.

GHASEMLOU et al., (2011), analisaram a viabilidade do uso da kefirana, um exopolissacarídeo obtido a partir de grãos kefir, como um novo material de formação de filme. Estudaram o uso da incorporação do glicerol nos filmes analisando suas características físicas, mecânicas e térmicas. Neste estudo foi confirmado que o glicerol torna os filmes mais flexíveis aumentando a deformação de ruptura. O aumento do teor de glicerol aumentou ainda a permeabilidade ao vapor de água dos filmes por outro lado, a temperatura de transição vítrea diminuiu conforme o aumento do teor do plastificante.

3.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUPORTES

Para a obtenção dos suportes, foi demonstrado que existem padrões de caracterização física. Eles podem ser divididos em quatro categorias: (1) morfologia (porosidade, tamanho de poro, área de superfície); (2) propriedades mecânicas (resistência à compressão e à tração); (3) propriedades de massa (degradação e suas propriedades mecânicas relevantes); e (4) as propriedades de superfície (energia de superfície e natureza química) (FRANCO et al., 2010).

As propriedades mecânicas são extremamente importantes na concepção de produtos da engenharia de tecidos. Os ensaios mecânicos podem ser divididos em ensaios estáticos, testes de estresse-relaxação, testes de tensão-deformação, e ensaios mecânicos dinâmicos (DUARTE, MANO, REIS, 2009).

A taxa de degradação dos suportes é um dos fatores mais importantes na concepção de produtos de engenharia de tecidos. Idealmente, a construção do suporte proporciona suporte

mecânico e bioquímico até que todo o tecido se regenere, sem qualquer alteração, e, em seguida, seja completamente biodegradado a uma taxa consistente com a geração do tecido. Estudos de imersão são utilizados para controlar a degradação das matrizes biodegradáveis (MARTINS et al., 2009). Assim, as alterações na perda de massa e peso molecular podem ser avaliadas pelo equilíbrio químico, microscopia eletrônica de varredura, e cromatografia de permeação em gel. A partir destes resultados, o mecanismo de biodegradação pode ser determinado.

É geralmente reconhecido que a adesão e proliferação de diferentes tipos de células em materiais poliméricos dependem em grande parte, das características de superfície, tais como a molhabilidade (hidrofilicidade / hidrofobicidade da energia livre de superfície), da sua composição química, carga iônica, rugosidade e rigidez. Em particular, as aplicações tridimensionais de engenharia de tecidos são mais importantes para a migração celular, proliferação celular, DNA / RNA e a apresentação fenotípica sobre os materiais de suporte (O'BRIEN, 2011).

3.5 ANÁLISES REOLÓGICAS

Propriedades reológicas são úteis no fornecimento de uma ampla compreensão da microestrutura de um filme (XU, LIU, ZHANG, 2006). Alguns pesquisadores relataram que uma solução de formação de filme com alta viscosidade tornaria difícil para remover as bolhas de ar e dificultar a fundição em camadas finas (CUQ et al., 1995). As soluções de formação de filme de baixa viscosidade também têm atraído a atenção de outros pesquisadores (MORAES et al., 2009). Nota-se que as propriedades reológicas, que são sensíveis a variações na estrutura molecular, são úteis no desenvolvimento de relações estrutura-função para sistemas de soluções de polissacárido (XU, LIU, ZHANG, 2006).

Uma análise da sua estrutura e a reologia pode proporcionar uma compreensão básica do material. Como também se sabe, se a concentração de polímero desempenha um papel importante na reologia da sua solução. Em solução diluída, as moléculas individuais do polímero são bobinas isoladas, enquanto que nas soluções concentradas, o volume hidrodinâmico total das cadeias individuais pode exceder o volume da solução (CHAMBERLAIN, RAO, 2000), sabendo se as interações intermoleculares diferem uns dos outros, resultando na alteração da reologia.

PIERMARIA et al. (2011) investigaram o efeito de diversos plastificantes como carboidratos (glicose, galactose e sacarose) e polióis (glicerol e sorbitol) nas propriedades de

filmes de kefirana. Os autores verificaram que os padrões de difração de raio-X dos filmes foram semelhantes (predominante amorfos), além de apresentarem valores baixos de a_w (abaixo de 0,5). Entretanto, apresentaram valores diferentes para permeabilidade de gases onde os filmes acrescidos de glicose ($3,0 \times 10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$) obtiveram os menores valores, em relação a resistência à tração e a enlogação na ruptura a maior mudança no perfil foi observada no uso do glicerol onde houve uma diminuição na resistência a tração (7,5 MPa) e aumento da enlongação na ruptura (130%).

3.6 BIOCOMPATIBILIDADE DE UM BIOMATERIAL

A grande diferença de biomateriais de outras classes de materiais é a sua capacidade de se manter em um ambiente biológico, sem danificar o ambiente e sem serem danificadas pelo processo (HUTMACHER, 2000).

A principal propriedade de um biomaterial refere-se à sua capacidade de manter suas propriedades mecânicas associada a uma resposta adequada ao hospedeiro, ou seja, a interface do tecido e do material devem coexistir, minimizando os efeitos indesejáveis. Estas condições são descritas como requisitos da biocompatibilidade (KARAGEORGIU, KAPLAN, 2005).

Deve-se ressaltar que as propriedades biológicas (respostas de um material em ambientes fisiológicos) são tão importantes quanto as propriedades mecânicas, para a seleção de um biomaterial. O aspecto mais importante do biomaterial é, por conseguinte, a forma como ele interage após ser implantado em um corpo humano ou animal.

Complicações podem ser observadas, devido a interações não desejáveis na interface biomaterial-tecido, quando os dispositivos são implantados. Tanto a ação do implante sobre os tecidos do hospedeiro como a ação do hospedeiro sobre o implante é importante na mediação de complicações e falhas do dispositivo. Em grande parte, estas interações resultam em alterações dos processos fisiológicos (normais) que compreendem os mecanismos de defesa do hospedeiro para proteger o organismo contra as ameaças externas (JACOBS et al., 2001).

Em contraste com os transplantes de órgãos vivos, biomateriais geralmente não são "rejeitados". O processo de rejeição de órgãos indica um processo inflamatório, que resulta de uma resposta imuno-específica e que provoca a morte de tecido, em que biomateriais sintéticos tipicamente não geram. A resposta usual para biomateriais compreende uma inflamação não específica. No entanto, segundo MITCHELL (2001), biomateriais derivados de tecido (tais como as biopróteses valvulares cardíacas) podem expressar antígenos de e serem capazes de

desencadear uma resposta imunológica, incluindo a produção de anticorpos, antígenos específicos e células T. No entanto, é importante compreender o seguinte: 1. Tecidos imunogênicos não necessariamente induz disfunção imunológica. 2. Respostas imunológicas específicas podem não ser apenas uma causa, mas podem resultar da falha do dispositivo. 3. A presença de células mononucleares não necessariamente indicar uma rejeição patogênica.

A maioria dos biomateriais de potencial de interesse clínico tipicamente provocar a reação de corpo estranho (RCE), uma forma especial de inflamação não específica. As células mais proeminentes na RCE são os macrófagos, que tentam fagocitar o material e são normalmente malsucedidas, ou seja, a completa fagocitose e a degradação do material, geralmente não ocorrem. Os macrófagos ativados, no processo de interação com um biomaterial, podem elaborar citocinas que estimulam a inflamação ou fibrose (ANDERSON, SCHOEN, 1992).

A natureza da reação é amplamente dependente das características químicas e físicas do implante. Para biomateriais mais inertes, a reação tecidual tarde é encapsulamento por uma cápsula de tecido fibroso relativamente fino (composta de colágeno e fibroblastos). Interações de tecidos podem ser modificadas, alterando a química da superfície, induzindo a aspereza ou porosidade para melhorar a ligação física para os tecidos circundantes, que incorpora um agente tenso-ativo para ligar quimicamente o tecido, ou usando um componente bioabsorvível para permitir a substituição lenta por tecido para simular as propriedades naturais de cura (HALLAB, MERRITT, JACOBS, 2001).

3.6.1 INFLAMAÇÃO E RESPOSTA AO CORPO ESTRANHO

A partir de uma perspectiva de biomateriais, colocar um biomaterial no ambiente in vivo requer injeção, inserção ou implantação cirúrgica. Todos estes métodos lesionam os tecidos ou órgãos envolvidos. O procedimento de implantação, inicia uma resposta à lesão pelo tecido, órgão, ou organismo e alguns mecanismos de defesa são ativados para manter a homeostase (ANDERSON, 2000).

Independentemente do tecido ou órgão no qual é implantado um biomaterial, a resposta inflamatória é ativada por uma lesão do tecido conjuntivo vascularizado.

Uma lesão no tecido vascularizado, a partir do procedimento de implante leva ao desenvolvimento imediato de uma matriz provisória no local do implante. Esta matriz provisória consiste de fibrina, produzida pela ativação dos sistemas de coagulação e trombose,

e em produtos inflamatórios liberados pelo sistema complemento, plaquetas são ativadas nas células inflamatórias e células endoteliais. Esses eventos ocorrem cedo, dentro de minutos a horas após a implantação de um dispositivo médico (ANDERSON, 2001).

A escassez de estudos *in vivo*, proporcionam uma perspectiva mais complexa. Pouco se sabe a respeito da matriz provisória, que se forma em interfaces de biomateriais e dispositivos médicos *in vivo*, embora algumas hipóteses tenham sido apresentadas em relação à capacidade de interação do biomaterial, sugerindo que alguns materiais e porções proteicas, são adsorvidas, no intuito de modular interações celulares através de moléculas adesivas e células (BRODBECK et al., 2001). O tipo de célula predominante presente na resposta inflamatória varia com a idade da lesão inflamatória.

Em geral, os neutrófilos predominam durante os primeiros dias após a lesão e, em seguida, são substituídos pelos monócitos como o tipo de célula predominante. Três fatores são responsáveis por essa mudança no tipo de célula: os neutrófilos são de curta duração e desintegram-se e desaparecem após 24-48 horas; a migração de neutrófilos da vasculatura para os tecidos é de curta duração; e fatores quimiotáticos para a migração de neutrófilos são ativados no início da resposta inflamatória (GALLIN, SNYDERMAN, 1999). Seguindo da migração da vasculatura, os monócitos diferenciam-se em macrófagos e estas células são de longa duração (até meses).

O tamanho, a forma e as propriedades físicas do biomaterial, podem ser responsáveis por variações na intensidade e duração do processo inflamatório ou de cicatrização de feridas. Assim, a intensidade e / ou tempo de duração da reação inflamatória pode caracterizar a biocompatibilidade do biomaterial.

Segundo HYNES (2002), vários aspectos devem ser observados, para compreender a resposta inflamatória e como ocorre a reação entre os tecidos e os biomateriais. Em primeiro lugar, apesar de mediadores químicos serem classificados em uma base estrutural ou funcional, diferentes sistemas de mediação ocorrem simultaneamente e fornecem um sistema de regulação e compensação em relação às suas respectivas atividades e funções. Em segundo lugar, os mediadores químicos são rapidamente inativados ou destruídos, sugerindo que a sua ação é predominantemente local, ou seja, no local do implante. Em terceiro lugar, em geral, as proteases lisossomais e os radicais livres de oxigênio produzem danos mais significativos às lesões. Estes mediadores químicos também são importantes na degradação dos biomateriais.

Apesar dos biomateriais em geral não serem fagocitados por macrófagos ou neutrófilos devido à disparidade no tamanho (a superfície do biomaterial é maior do que o tamanho da célula), certos eventos na fagocitose podem ocorrer. O processo de reconhecimento e de fixação

é acelerado quando o agente prejudicial é revestido por fatores do soro que ocorrem naturalmente. Estes fatores são denominados de "opsoninas". Os dois principais são opsoninas de imunoglobulina G (IgG) e o fragmento ativado pelo complemento, C3b. Ambas as proteínas derivadas de plasma são conhecidas por adsorverem os biomateriais (HYNES, ZHAO, 2000).

A resposta inflamatória aguda em organismos com biomateriais é geralmente de curta duração e é confinado ao local do implante. O macrófago é provavelmente o elemento mais importante na célula da inflamação crônica por causa do grande número de produtos biologicamente ativos que podem produzir. Importantes classes de substâncias produzidas e secretadas pelos macrófagos incluem proteases neutras, fatores quimiotáticos, metabólitos do ácido araquidônico, metabólitos reativos de oxigênio, componentes do complemento, fatores de coagulação, fatores de promoção do crescimento e citocinas (MCNALLY, ANDERSON, 2002).

Fatores de crescimento liberados por células ativadas podem estimular a produção de uma ampla variedade de células; iniciar a migração celular, diferenciação, e remodelação de tecidos; e pode estar envolvida em várias fases de cicatrização de feridas.

3.6.2 TECIDO GRANULOSO

No dia seguinte à implantação de um biomaterial, ou seja, quando ocorre uma lesão, a resposta de cicatrização é iniciada pela ação dos monócitos e dos macrófagos. Os fibroblastos e as células endoteliais vasculares no local de implante proliferam e começam a formar tecido de granulação, que é o tipo especializado de tecido que é a marca de cicatrização em inflamação. O tecido de granulação deriva seu nome a partir de um aparecimento granular rosa e macio, na superfície da cicatrização de feridas. Suas características histológicas incluem a proliferação de pequenos novos vasos sanguíneos e fibroblastos (NGUYEN, D'AMORE, 2001).

Os fibroblastos também proliferam no desenvolvimento de tecido de granulação e são ativos na síntese do colágeno e proteoglicanos. Nos estágios iniciais do desenvolvimento do tecido de granulação, proteoglicanos predominam, seguidos do aparecimento de colágeno, especialmente o colágeno tipo III, que predomina e forma a cápsula fibrosa.

3.6.3 REAÇÃO DE CORPO ESTRANHO

Como discutido anteriormente, a forma e a topografia da superfície do biomaterial pode determinar uma reação do organismo sobre o corpo estranho. Com materiais biocompatíveis, a

reação de corpo estranho no local do implante pode ser controlada pelas propriedades da superfície do biomaterial, a forma do implante, e a relação entre a área de superfície do biomaterial e o volume do implante.

A reação de corpo estranho que consiste principalmente da presença de macrófagos e / ou células gigantes de corpo estranho podem persistir na interface tecido-implante para a vida útil do implante.

Segundo PIERCE (2001), embora sejam geralmente considerados que as propriedades químicas e físicas do biomaterial são responsáveis pela ativação de macrófagos, os eventos subsequentes relacionados às atividades dos macrófagos na superfície não são claras. Macrófagos teciduais, derivados de monócitos do sangue circulante, podem coalescer para formar células gigantes de corpo estranho multinucleadas. Não é incomum o aparecimento de células gigantes, contendo um grande número de núcleos, na superfície dos biomateriais. Essas células gigantes podem persistir por toda a vida útil do implante. Entretanto, não se sabe se serão ativadas, liberando os seus constituintes lisossomais, ou se serão inativadas ao longo do tempo.

3.6.4 ENCAPSULAMENTO FIBROSO

O estágio final da resposta de cicatrização após o implante de biomateriais é geralmente o encapsulamento fibroso. A reparação dos locais do implante pode envolver dois processos distintos: a regeneração, que é a substituição do tecido lesado por células do parênquima do mesmo tipo, ou a substituição por tecido conjuntivo que produz uma grande quantidade de colágeno, levando a formação da cápsula fibrosa. Estes processos são geralmente controlados pela capacidade proliferativa das células do tecido ou órgão que receberam o implante (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2003).

Após lesão, as células podem sofrer adaptações de crescimento e diferenciação. Adaptações celulares importantes são atrofia (diminuição no tamanho ou na função da célula), hipertrofia (aumento do tamanho da célula), hiperplasia (aumento no número de células), e metaplasia (mudança de tipo de célula). Outras adaptações incluem uma mudança por células que são capazes de modificar proteínas (mudança fenotípica), ou superprodução de determinadas proteínas. Este pode ser o caso em células produtoras de vários tipos de colágenos e proteínas da matriz extracelular na inflamação crônica fibrosa (BENJAMINI, COICO, SUNSHINE, 2000).

Os fatores locais e sistêmicos podem desempenhar um papel na resposta de cicatrização de feridas ou implantes de biomateriais. Os fatores locais incluem o local de implantação (tecido ou órgão), a adequação do suprimento de sangue, e o potencial de infecção. Fatores sistêmicos podem incluir nutrição, perturbações hematológicas, esteróides glucocorticais e doenças pré-existentes, tais como aterosclerose, diabetes e infecções (JANEWAY, CHARLES, MEDZHITOV, 2002).

3.7 ENGENHARIA DE TECIDOS

Segundo o registro brasileiro de transplante (RBT, 2014), no primeiro trimestre de 2014 foi observado uma queda de 3,0% na taxa de doadores efetivos e de 4,8% na de doadores com órgãos transplantados, à custa da diminuição de 3,5% na taxa de efetivação da doação. A diminuição da disponibilidade de órgãos para transplante gera no campo da engenharia de tecidos uma necessidade crescente de substitutos à altura.

A engenharia de tecidos é um termo amplo que descreve um conjunto de ferramentas na interface das ciências biomédicas e engenharia, que utilizam células vivas ou atraem células endógenas para auxiliar na formação de tecido ou na regeneração e, assim, produzir terapias e prognósticos benéficos. No modelo mais frequente, as células são cultivadas em um suporte composto de polímero sintético ou material natural (colágeno ou tecido tratado quimicamente), (VACANTI, 1993; FUCHS, NASSERI, VACANTI, 2001; GRIFFITH, NAUGHTON, 2002; RABKIN, SCHOEN, 2002; LANGER, VACANTI, 1999).

Os desafios da engenharia de tecido estão sendo focados em três componentes principais: sistema de célula, suporte e biorreator, além do controle dos vários parâmetros na fabricação do dispositivo que pode ser de grande impacto no resultado final. Novas possibilidades são abertas pelos avanços na tecnologia de células-tronco (BLAU, BRAZELTON, WEIMANN, 2001; BIANCO, ROBEY, 2001) e as evidências recentes de que algumas células multipotentes possivelmente capazes de regenerar tecidos são liberadas pela medula óssea e circulam sistemicamente (HIRSCHI, GOODELL, 2002), enquanto outras podem estar presente em órgãos tais como o coração e o sistema nervoso central que antes não eram considerados capazes de serem regenerados (HIRSCHI, GODDELL, 2002; NADALGINARD et al., 2003; JOHANSSON et al., 2004; ORLIC et al, 2003).

Processos metodológicos na engenharia de tecidos já foram alcançados para a substituição da pele em uso clínico. Outros exemplos de abordagens clínicas de engenharia de

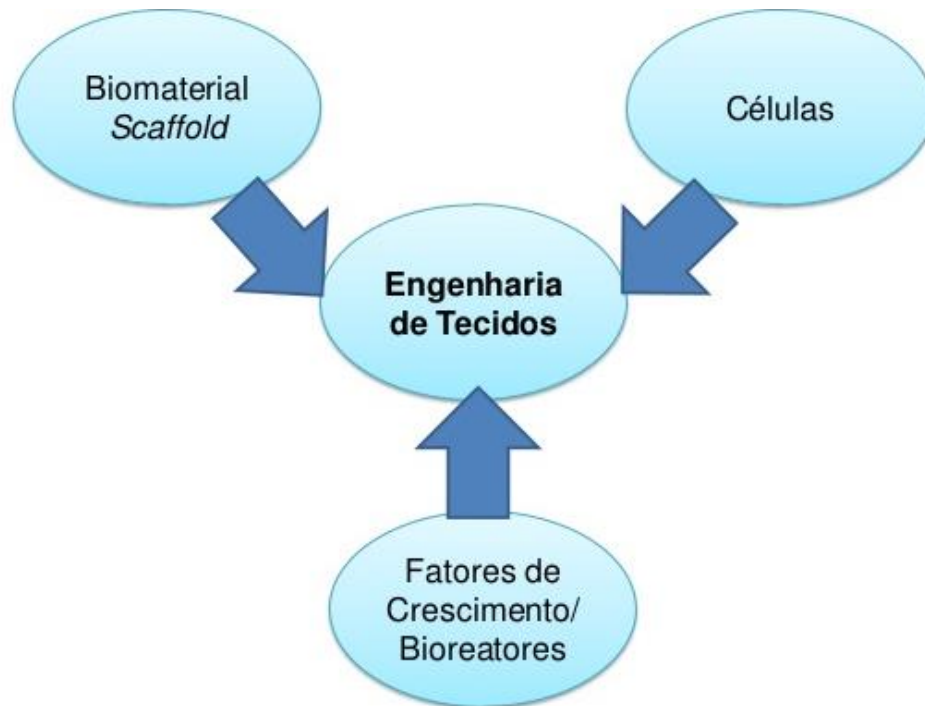
tecidos anteriores e em curso incluem a regeneração de cartilagem usando transplante autólogo de condrócitos (BRITTBURG, 2008). Outra abordagem utiliza órgãos artificiais extracorpóreo utilizando células que são isoladas a partir de sangue ou de tecidos do receptor por uma membrana impermeável (COLTON, 1995; HUMES et al., 1999; NEUBERGER, 2002).

Um dos principais desafios na engenharia de tecidos é entender quantitativamente como as células respondem a sinais moleculares e integram múltiplas entradas para gerar uma determinada resposta, e controlar as interações não específicas entre as células e um biomaterial. A engenharia de tecidos busca entender a relação estrutura / função em tecidos normais e patológicos, controlando a resposta celular no tecido lesionado a partir do implante de biomateriais, por meio de produtos químicos, farmacológicos, mecânicos e por manipulação genética. Este é um campo extremamente promissor.

Desde 1980, os pesquisadores desenvolveram muitas técnicas inovadoras para moldar polímeros em arquiteturas complexas que exibem as propriedades desejadas para aplicações específicas engenharia de tecidos. Estas técnicas de fabricação resultam em suportes reproduzíveis para a regeneração de tecidos específicos (CHUN et al., 2010).

Para reconstruir um novo tecido com a engenharia de tecidos, os componentes da tríade são necessários (Figura 5). Estas incluem: (1) as células colhidas e dissociadas a partir do tecido do doador; (2) biomateriais como substratos de suporte no qual as células são anexadas e cultivadas, resultando em implantação no desejado local do tecido funcionando; e (3) fatores de crescimento, que promove e a adesão celular, proliferação, migração, regulação, diferenciação e a síntese de proteínas (BOISSARD et al., 2009).

Figura 5: Tríade da engenharia de tecidos.



A função do suporte é a de conduzir o crescimento das células cultivadas ou no interior da estrutura porosa do suporte ou migrando para o tecido circundante. A maioria dos tipos de células de mamíferos é dependente de fixação, o que significa que pode morrer se um substrato de aderência não for fornecido.

O suporte pode fornecer um ambiente para as células depositarem sua matriz extracelular. Para tanto, o suporte tem de proporcionar um substrato apropriado para a fixação das células, proliferação celular, diferenciação e a migração célula (GELINSKY, 2009).

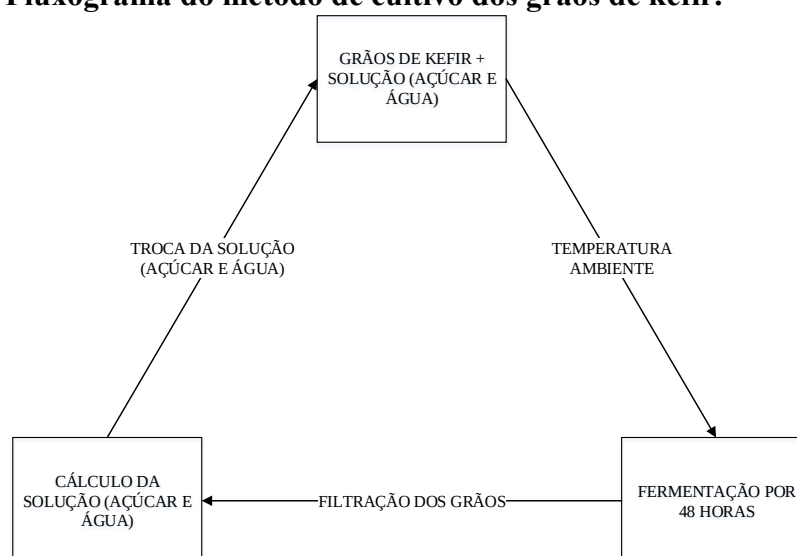
Apesar das propriedades da kefirana, não existe nenhum relato na literatura com o uso deste biopolímero como suporte de cultivo celular.

4. METODOLOGIA

4.1 PRODUÇÃO DO KEFIR

A cultura do kefir foi previamente coletada de consumidores habituais do produto, e mantida utilizando-se o método descrito por ONOFRE (2014). Este método determina que a massa dos grãos drenados seja pesada (g) e multiplicada por 1,5 que é o fator de base para o cálculo do volume de solução de açúcar mascavo a 50% (m/v) a ser adicionada. A solução de açúcar mascavo foi filtrada para remover possíveis impurezas presentes no mesmo. Os grãos foram mantidos em temperatura ambiente $\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e foram realizadas múltiplas repicagens a cada 48 horas. A (Figura 6) apresenta um fluxograma do método de cultivo dos grãos de kefir.

Figura 6 – Fluxograma do método de cultivo dos grãos de kefir.

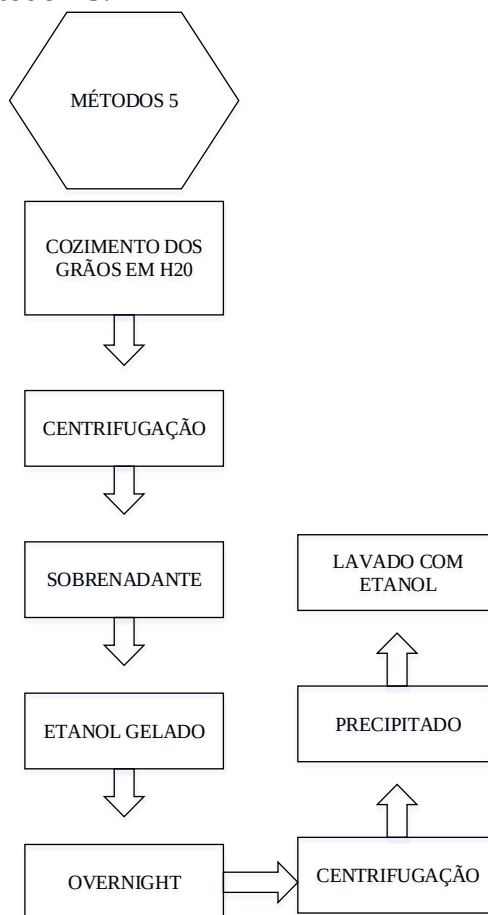


O processo de clareamento dos grãos foi adicionalmente realizado seguindo o método descrito por ONOFRE (2014), onde os grãos, antes da extração da kefirana, foram cultivados em solução de açúcar cristal a 50% (m/v), sendo realizadas três repicagens.

4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA KEFIRANA

Inicialmente, a extração da kefirana foi realizada pelo protocolo descrito por MOREIRA et al., (2008) (Figura 7), onde após crescimento exponencial da cultura em torno de 7 dias, os grãos foram colocados em Becker contendo água destilada fervente, na proporção de 1:2 sendo mantida sob agitação e fervura, em agitador magnético (IKA RH basic 1) durante 1 hora. Após esse período, a mistura foi resfriada, filtrada e centrifugada (Hettich Zentrifugen, Universal 320R) a 1.920 g por 20 minutos. O precipitado foi então descartado e em seguida adicionou-se um volume igual de etanol (93 ° inpm) gelado ao sobrenadante. Em seguida, o produto foi mantido sob 4°C por 15 horas (overnight), sucedendo-se a centrifugação a 1920 g por 20 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi recolhido e lavado duas vezes com etanol (método T5). A partir deste, outros métodos foram desenvolvidos, onde após crescimento da cultura os grãos foram pesados e triturados.

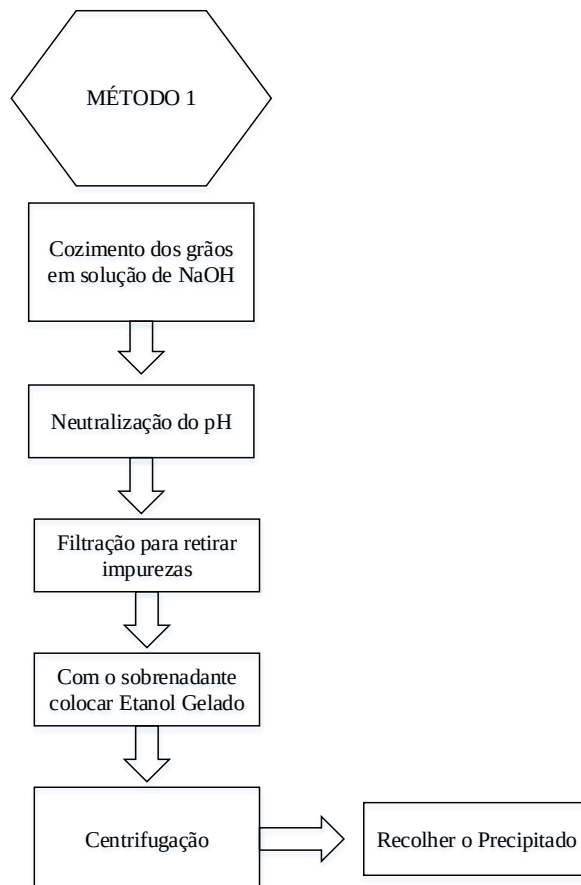
Figura 7 - Fluxograma para extração de kefirana pelo método descrito por Moreira et al. (2008) –Método T5.



4.2.1 MÉTODO DE EXTRAÇÃO 1 (T1)

Este método segue o descrito por ONOFRE (2014), nele os grãos de kefir foram lavados com água destilada a temperatura ambiente por duas vezes. Os grãos secos foram transferidos para um Becker e foi adicionada uma solução de hidróxido de sódio P.A [1: 2 (m / v)] - NaOH (Cinética) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, sendo mantida sob agitação a uma temperatura entre $80 - 90^{\circ}\text{C}$, em agitador magnético (IKA RH basic 1) por cerca de 40 minutos. Após esse período, a solução foi neutralizada com uma solução de ácido clorídrico – HCl (Dinâmica) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, com auxílio de pHmetro (Metrohm Swiss Made, 827 pH lab), com posterior filtração para remoção dos grãos não solúveis. Ao filtrado foi adicionado etanol ($92,8^{\circ} \text{ inpm}$) gelado [1: 2 (v / v)] seguido de centrifugação a 1920 g durante 15 minutos. O precipitado foi colocado para secar até obtenção de peso constante (Mf) e finalmente pulverizada e mantidos em um local seco. Este método foi denominado de extração 1, ou T1 (Figura 8).

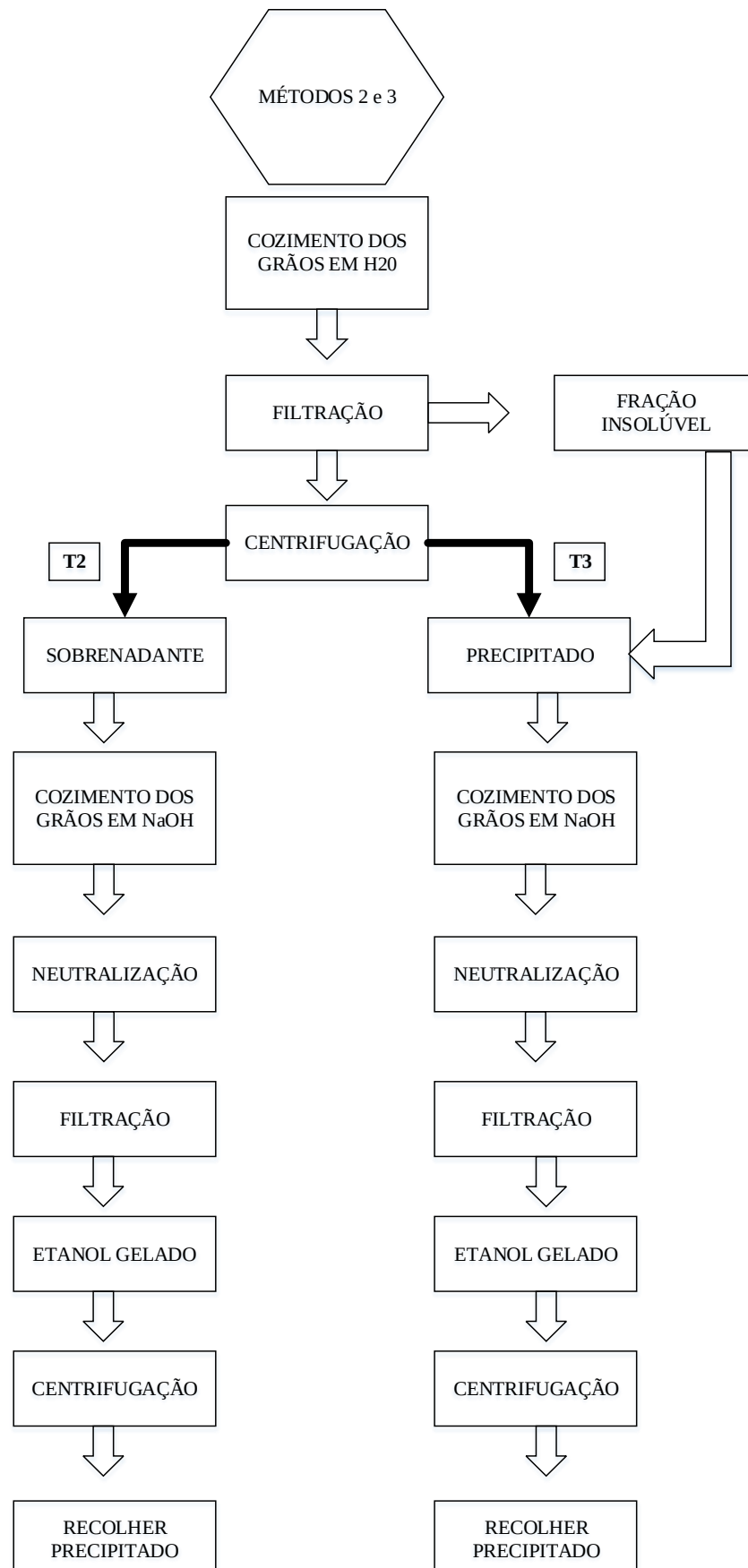
Figura 8 – Fluxograma para extração de kefirana pelo método descrito por Onofre (2014) –Método T1.



4.2.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO 2 E 3 (T2 E T3)

Adicionalmente foram elaboradas algumas modificações para extração da kefirana. Os grãos de kefir foram pesados e triturados. O material (100 g) foi transferido para um Becker e foi adicionado 200 mL água destilada [1: 2 (m / v)]. A suspensão foi mantida sob agitação a uma temperatura entre 80 – 90°C por 40 minutos, em agitador magnético (IKA RH basic 1). Em seguida a suspensão foi filtrada para separação do material solúvel em água quente e o filtrado foi submetido à centrifugação a 1920 g durante 10 minutos. O precipitado foi reunido ao material insolúvel. Nesta etapa foram separados o sobrenadante (denominado de método de extração 2, ou T2) e o precipitado (método de extração 3, ou T3) (Figura 9). T2 e T3 foram submetidos separadamente ao cozimento com NaOH, seguindo o protocolo descrito em 4.2.1 até obtenção do material pulverizado de cada método.

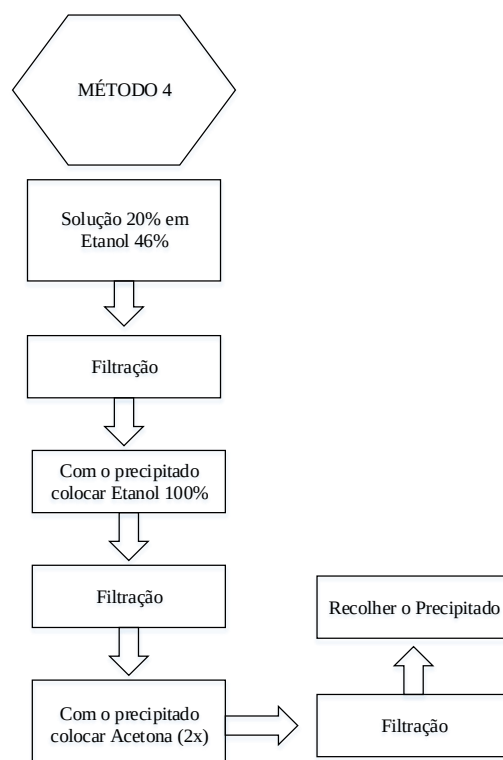
Figura 9 – Fluxograma para extração de kefirana pelos métodos denominados T2 e T3 desenvolvidos neste trabalho.



4.2.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO 4 (T4)

Adicionalmente foi aplicado aos grãos de kefirana, um novo protocolo de extração denominado de extração 4, ou T4, baseado na metodologia desenvolvida por ALBUQUERQUE et al. (2014), para extração de galactomananas. Foi preparada uma suspensão de kefirana a 20 % em água, que foi submetida à precipitação utilizando-se uma solução de etanol a 46 % [1: 3 (v / v)], durante 18 h a 5 °C. O precipitado branco obtido foi filtrado em tela de serigrafia (110 mesh) e a solução etanólica foi descartada. O filtrado foi novamente ressuspensionado em etanol P.A. (Vetec) gelado (5 °C) [1: 3 (m / v)], durante 30 minutos. O mesmo procedimento foi repetido duas vezes. Após purificação com etanol, o filtrado foi ressuspensionado por duas vezes consecutivas com acetona P.A. (Dinâmica) [1: 3 (m / v)], durante 30 min seguindo o mesmo protocolo de filtração. A kefirana obtida foi submetida à secagem em estufa a 37 °C até peso constante (Mf) e finalmente pulverizada e mantida em local seco (Figura 10).

Figura 10: Fluxograma de extração da kefirana descrito ALBUQUERQUE et al., (2014) (método T4)



O rendimento das extrações (R) foi calculado pela diferença do peso inicial (P_i) e final [peso seco] (P_f) de cada processo, a partir da Equação 1.

$$R(\%) = \frac{P_f}{P_i} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

O delineamento experimental para a comparação dos rendimentos foi totalmente casualizado com três repetições.

4.3 ESTIMATIVA DO TOTAL DE CARBOIDRATOS

Foi realizada através do método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956 e KRISHNAVENI, BALASUBRAMANIAN, SADASIVAM, 2009), onde em meio ácido e quente o monossacarídeo é desidratado, formando um produto colorido, com máximo de absorção em 490 nm. Após a leitura da absorbância, foi realizado o cálculo da quantidade de carboidratos presentes na solução da amostra através da equação 2. Foi elaborada uma curva de calibração e as amostras foram secas em estufa (até obter peso constante), antes de realizar o procedimento.

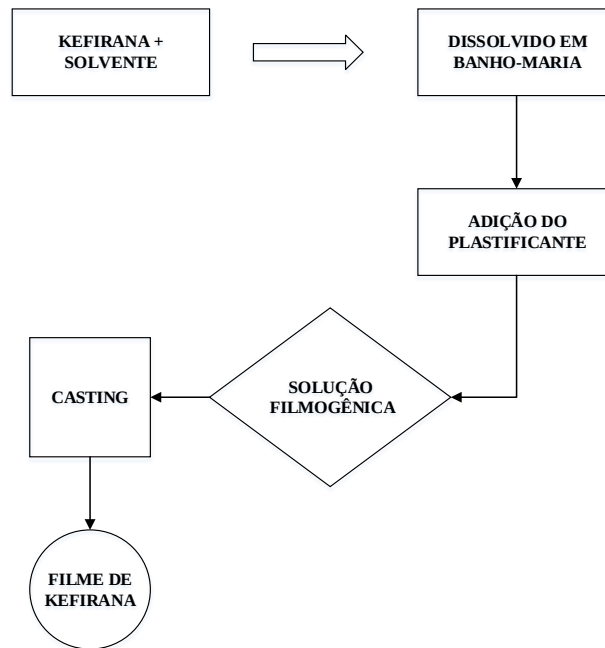
$$C(\%) = \frac{x}{0,1} \times 100 \text{ mg de glicose} \quad (\text{Equação 2})$$

Adicionalmente foi calculado o valor de rendimento de carboidratos totais em relação à massa inicial.

4.4 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS

Os filmes foram obtidos pelo sistema de “casting” que consiste na deposição da solução filmogênica sobre o molde de poliestireno e em seguida, o solvente é eliminado por evaporação em capela de exaustão, resultando na formação de uma película (filme) do material desejado. Foram produzidos filmes com todos os métodos de extração, onde 0,3 g do polímero em pó foi dissolvido em 20 mL de NH_4OH P.A. (Cinética), em banho-maria com temperatura entre $85^\circ\text{C} \pm 5^\circ$. A seguir foi adicionado 0,15 g de glicerol P.A. (Dinâmica) como plastificante. A solução foi vertida em uma placa de Petri e a secagem foi realizada em capela de exaustão a temperatura ambiente por 24 horas (Figura 11). Valores obtidos em experimentos anteriores.

Figura 11: Fluxograma da metodologia de desenvolvimento de filmes poliméricos.



4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Após avaliar o rendimento, após isolamento dos carboidratos determinando a pureza dos mesmos, foram selecionados os melhores métodos (T2 e T4) para avaliação das propriedades microestruturais, físicas, mecânicas e espectroscópicas dos polímeros e dos seus respectivos filmes.

4.5.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Para verificar o grau de cristalinidade das amostras, utilizou-se um equipamento de Difração de Raios-X modelo XRD 7000 da SHIMADZU instalado no DF-UFPE (Figura 12), com alvo de Cobre e $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$. Os polímeros de kefirana analisados foram obtidos a partir dos métodos T2 e T4.

Figura 12: DRX modelo XRD700 da Shimadzu.



4.5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DA KEFIRANA

Realizou-se a espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), utilizando um espectrofotômetro (BRUKER IFS66), na Central Analítica, Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE, utilizando um intervalo de número de onda de 4000-

650 cm⁻¹, a fim de se identificar os grupos funcionais presentes nas amostras de kefirana dos métodos T2 e T4.

4.5.3 ESPESSURA

As espessuras dos filmes T2 e T4 foram obtidas com auxílio de um micrômetro (Great Wall, 428840), de precisão 0,01 mm. Foram realizadas medidas de cada tratamento, em triplicata, aferindo a medida de 5 pontos diferentes de cada amostra, totalizando 15 medidas de cada filme. O resultado foi obtido a partir da média aritmética das medidas.

4.5.4 TRANSPARÊNCIA

Para a determinação da transparência (T) dos filmes T2 e T4, foi o método descrito por HAN, FLOROS (1997), onde foram consideradas as absorbâncias dos filmes a 600 nm (A_{600}) e a espessura dos mesmos em mm (x). A transparência foi então calculada através da equação de HAN, FLOROS (1997). (Equação 3).

$$T = \frac{-\log A_{600}}{x} \quad (\text{Equação 3})$$

Adicionalmente, foi realizada uma análise na região do visível, utilizando-se uma varredura entre 400 e 800 nm no equipamento de UV-vis (Shimatzu), para verificar a presença de algum máximo de absorção que pudessem prejudicar a transparência do filme.

4.5.5 TEOR DE UMIDADE

O teor de umidade dos filmes T2 e T4, foi avaliado através da medida de perda de peso, segundo FERREIRA et al. (2014). Para isso, amostras de cada filme, foram pesadas em balança analítica com quatro casas decimais (Shimadzu AUY 220) e em seguida aquecidas em estufa de secagem (Nova Técnica NT513) a $105 \pm 1^\circ\text{C}$, até peso constante. As amostras foram então resfriadas em dessecador até temperatura ambiente. A umidade contida nas amostras foi relacionada à perda de peso, de acordo com a equação 4.

$$U\% = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

4.5.6 ÂNGULO DE CONTATO

As medidas de ângulo de contato foram efetuadas no Laboratório de Polimeros e Nanoestruturas (DEN/UFPE), através de um goniômetro (Data Physics) equipado com uma micro-seringa capaz de produzir gotas de diferentes volumes. Para as medidas de ângulo de contato foram utilizadas 3 amostras de cada recobrimento, cuidadosamente limpas. Foram realizadas 5 medidas para cada tipo de recobrimento, considerando um volume de 5,0 µL de água deionizada depositada sobre a superfície. As medidas foram efetuadas em pontos distintos das amostras. A taxa de deposição da água sobre a superfície foi de 0,50 µL/s. As medidas do ângulo formado entre uma gota de água e a superfície do recobrimento foram obtidas utilizando o Software Image Tool.

4.5.7 RESISTÊNCIA À TRAÇÃO

Os ensaios de resistência à tração dos filmes T2 e T4, foram realizados no Laboratório de Engenharia Biomédica (LEB) da UFPE. A resistência à tração foi determinada utilizando uma Máquina Universal de Ensaio (WDW 300E) acoplada ao software WinWdW. O ensaio foi realizado de acordo com a norma ASTM D-638, utilizando uma força de carga de 0,4 KN e velocidade de 25 mm/min. O delineamento experimental totalmente casualizado, com quatro repetições de cada amostra.

4.5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para análise de MEV amostras do filme T4, foram metalizadas e posteriormente, os filmes foram analisados em um microscópio eletrônico de varredura JEOL, JSM-5900 no Departamento de Física e no Departamento de Química da UFPE – Figura 13. Os filmes foram metalizados no Fine Coat – 1100 – JEOL para prevenir a acumulação de campos elétricos estáticos e melhorar o contraste da amostra (Figura 13).

Figura 13: MEV do DF-UFPE. Modelo JSM 5900 – JOEL.



4.5.9 ANÁLISES VISCOSIMÉTRICAS

Foram realizadas análises viscosimétricas de amostras de kefirana do método T4 dissolvidas em água para tanto o polímero foi solubilizado em água por 7 dias a 100 °C por 12 horas/dia. As análises foram realizadas em um viscosímetro capilar tipo Ostwald, nº 75, imerso em banho termostático, na temperatura de $(30 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C})$. Esse experimento permitiu determinar a viscosidade relativa, a qual foi obtida pela relação (Equação 5):

$$\eta_{rel} = \frac{t_o}{t} \quad (\text{Equação 5})$$

sendo t e t_0 os tempos de escoamento da solução e do solvente, respectivamente. Que por sua vez, forneceu a viscosidade específica (Equação 6):

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (\text{Equação 6})$$

e a viscosidade reduzida (Equação 7):

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (\text{Equação 7})$$

em que C representa a concentração da solução. Assim, foi obtida a viscosidade intrínseca, $[\eta]$, pela extrapolação da viscosidade reduzida à concentração zero (Equação 8), conforme a relação de Huggins (ROSEN, 1993):

$$\eta_{red} = [\eta] + K_H [\eta]^2 C \quad (\text{Equação 8})$$

sendo K_H uma constante de proporcionalidade (constante de Huggins) próxima de 0,4 para diversos sistemas polímero-solvente.

Adicionalmente a kefirana também foi irradiada com radiação gama proveniente de uma fonte de Co^{60} , a uma taxa de dose de aproximadamente de 3,257 kGy/h (Outubro de 2014), no Laboratório de Radiação Gama – GAMALAB/DEN/UFPE. As amostras foram irradiadas nas doses de 15, 25 e 50 kGy. A irradiação das amostras ocorreu na presença de ar atmosférico e à temperatura ambiente da sala ($\approx 25^\circ C$).

4.5.10 AVALIAÇÃO DOS FILMES DE KEFIRANA PARA CULTIVO CELULAR

Os ensaios foram realizados em sextuplicata em uma placa de 24 poços para cultivo celular de poliestireno (Fundo Chato; Volume do poço 3,29 ml, diâmetro de 15,4mm e área de crescimento de $1,91cm^2$). Para controle positivo foi reservada uma fileira em sextuplicata sem filme. A placa foi esterilizada com radiação gama em um equipamento com uma fonte de Co^{60} com taxa de dose de 3,257 KGy/h no DEN/UFPE. Foram utilizadas células tronco mesenquimais obtidas no Laboratório Oleg Krasinikov do Departamento de Biofísica e Radiobiologia/UFPE. As células foram isoladas utilizando-se o método originalmente descrito por FRIEDENSTEIN et al., 1976, que se baseia na capacidade de aderência das células ao poliestireno. O material utilizado nos ensaios foi proveniente de células aspiradas de cordão umbilical humano, que foi processado utilizando-se ficoll, estabelecendo-se um gradiente de centrifugação. As células foram coletadas e plaqueadas em garrafas, com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (DMEM; Catálogo nº10829-018, Lote: 1209477), enriquecido com soro fetal bovino 10% ([FBS] Catálogo nº10270106, Lote: 40Q3534K) e 10 U/ml de penicilina G, 10 $\mu g/ml$ de estreptomicina e 25 $\mu g/ml$ de anfotericina B (Catalogo nº15240-096, Lote: 1185890) (PETERSON et al., 2011). Após 24h a 72h (TONDREAU et al., 2004). Todo o meio de cultivo foi trocado a cada 3 - 4 dias com o objetivo de remover as células não aderentes. As células restantes foram cultivadas em câmara úmida, a $37^\circ C$ com 5% de CO_2 e o meio de cultivo trocado com a mesma periodicidade, até atingir confluência em torno de 80%, o que ocorreu por volta de 14 dias. As células foram tripsinizadas e expandidas por passagens subsequentes (PITTENGER et al., 1999). Para a contagem, foi utilizado 0,1mL da suspensão celular e adicionado 0,1 mL de azul de trypan e 0,8 mL de meio de cultura. Esta suspensão celular foi transferida para a câmara de Neubauer com auxílio de uma pipeta Pasteur e as células foram contadas, excluindo-se aquelas que se apresentaram coradas de azul (células não viáveis). Para o cálculo do número de células foi utilizada a Equação 9:

$$NC \times D \times 10^4 / \#Q \quad (\text{Equação 9})$$

onde NC= número de células vitais contadas; D= diluição da amostra (10) e #Q= número de quadrados da câmara de Neubauer usados para contagem das células.

A viabilidade foi sempre maior que 95%, e o número de células plaqueadas foram 2000 células / poço.

4.5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

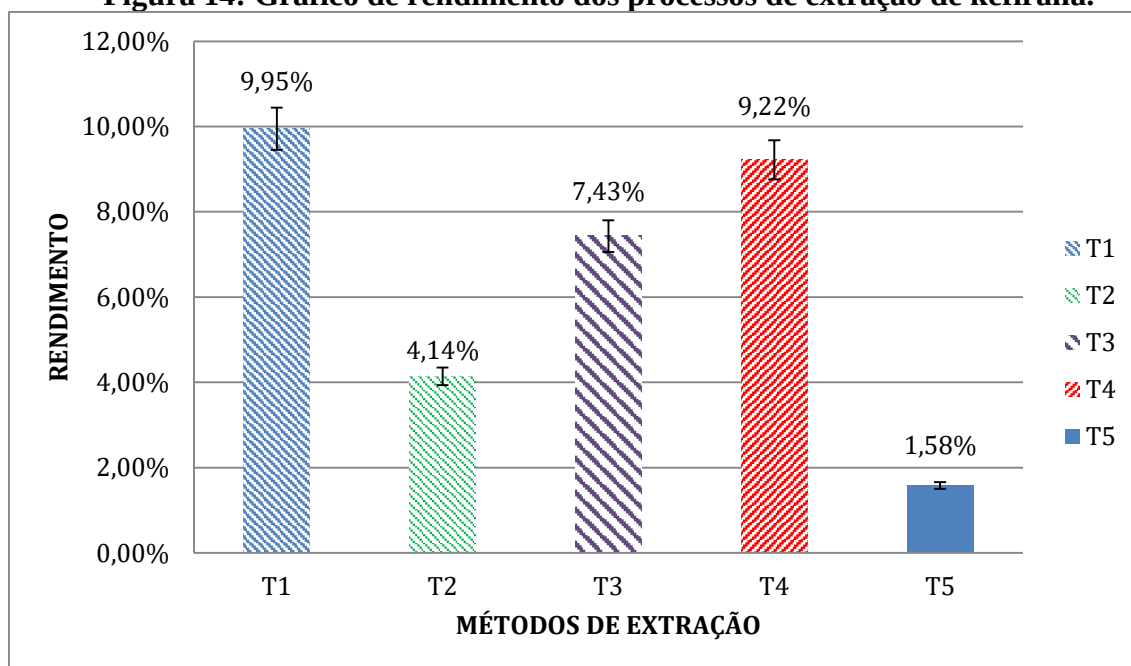
Para a análise da diferença estatística entre os dois métodos de extração da kefirana foram aplicados o teste t de Student, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados dos ensaios físicos e mecânicos foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para comparação de médias, também com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico Prism5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA KEFIRANA

Os métodos T1 e T4 obtiveram os maiores rendimentos de extração (9,95 e 9,22 %, respectivamente), obtendo diferenças estatisticamente significativas em comparação com os outros métodos T2, T3 e T5 (4,14, 7,43 e 1,58%, respectivamente) (Figura 14). Ressalta-se que as extrações foram obtidas a partir de diferentes métodos, portanto espera-se que estas técnicas possam refletir nas características físico-químicas dos polissacarídeos obtidos, no rendimento das extrações e no grau de pureza dos carboidratos obtidos.

Figura 14: Gráfico de rendimento dos processos de extração de kefirana.



A diferença básica entre o tratamento de melhor rendimento (T1, 9,95%) e o de pior performance (T5, 1,58%) está no emprego de uma solução alcalina NaOH 0,1 mol.L⁻¹ na fase de solubilização do polissacarídeo em T1, por outro lado o protocolo preconizado por Moreira et al. (2008) a solubilização das cadeias dos polissacarídeos apenas com o uso do calor. Apesar de não ser relatado para a extração de polissacarídeos do kefir, o uso de soluções alcalinas para solubilização e extração de polissacarídeos foi empregada para diversos autores (SILVA, 1998; VRIESMANN et al., 2004; DIAS et al., 2008; ASSIS, BRITTO, 2014; BASTOS, 2013).

O uso de solução alcalina nos tratamentos T1, T2 e T3, podem em tese, auxiliar no processo de extração de carboidratos como descrito por MCHUGH (1987) o qual relata que

soluções alcalinas de carbonato de sódio são utilizadas para a extração de alginatos de algas marrons. BASTOS (2013) utilizou soluções neutras e alcalinas para a extração de diferentes polissacarídeos da parede celular de leveduras. DIAS et al., (2008) também emprega o NaOH para solubilização de lentinan, uma β -glucana extraída do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*).

Os tratamentos T2 e T3 combinam a extração em água quente e em NaOH, no ensaio T3 podemos constatar que após a extração por água ainda foi possível extrair polissacarídeos utilizando-se soluções alcalinas, observa-se desta forma que após o cozimento em água ainda é possível extrair polissacarídeos. De forma semelhante VRIESMANN et al., (2004) e DENG et al., (2013) utilizaram extrações sequenciais em água, e soluções aquosas de EDTA, Na_2CO_3 e KOH, para extrair diferentes tipos de polissacarídeos de frutos cambuí (*Myrciaria tenella*) e rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) respectivamente.

Nos ensaios de RIZZI (2010) também foram utilizadas extrações sequenciais na extração de carboidratos de microalgas marinhas. *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta) apresentou um rendimento para extração aquosa de 10,7% e para extração alcalina de 54,6% com preponderância de α -glucana por outro lado, para *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyta, Haptophyta) apresentou um rendimento para extração aquosa de 29,8% e para extração alcalina de 6,7% com preponderância de β -glucana. Uma terceira alga foi estudada *Thalassiosira fluviatilis* (Ochrophyta, Stramenopiles) e neste caso foram realizadas duas extrações ácidas sequenciais onde foram extraídas β -glucana. Estes resultados indicam que a escolha do tipo de extração depende do organismo estudado e do tipo de carboidrato desejado.

O sistema de produção de quitosana realizada a partir de resíduos da carnicultura também utilizando NaOH, mas neste caso o principal objetivo do emprego desta solução é a desproteínização do resíduo (ASSIS, BRITTO, 2014; DIAS et al., 2008). Pode-se inferir que o uso de NaOH no tratamento T2 na fração sobrenadante poderia também levar a um eventual processo de desproteínização aumentando deste modo a taxa de extração. Este fator pode ser relevante visto que em algumas culturas o teor de proteínas nos grãos de kefir atingiu 9,23% (WESCHENFELDER et al., 2011).

Em relação aos dois tratamentos cujos os rendimentos foram acima de 9% (T1 e T4) estes basearam-se em estratégias de extração de carboidratos diferenciadas. No primeiro método, utilizou-se uma solução alcalina (NaOH) para aumentar a solubilidade do polissacarídeo. Foi observado que, o rendimento obtido na extração de polissacarídeos pelo método T1 é semelhante ao encontrado por ONOFRE (2014), quando utilizou a mesma técnica de extração. GOMES (2014) também utilizando solução alcalina de hidróxido de sódio 1 M

para extrair xilana de sabugos de milho, obteve um rendimento de $9,30\% \pm 1,51$, próximo a aqueles obtidos pelos métodos T1 e T3.

Por outro lado, o tratamento T4 descrito por ALBUQUERQUE et al. (2014) para a extração de galactomanana, a partir de sementes de *Cassia grandis*, é baseado na solubilização em água quente e precipitação dos carboidratos em solução hidroalcoólica, seguida de lavagens sucessivas em solventes orgânicos de diferentes polaridades.

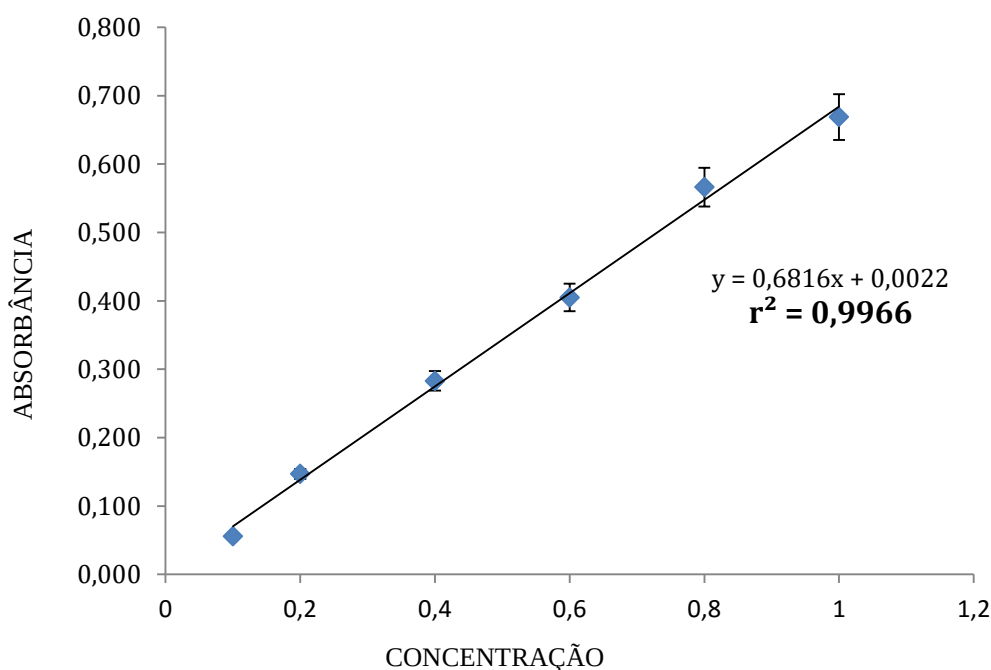
5.2 ESTIMATIVA DO TOTAL DE CARBOIDRATOS

Para estimativa do total de carboidratos foi estabelecida inicialmente uma curva-padrão de glicose (Figura 15), neste ensaio o valor de r^2 obtido foi de 0,9966 e a equação obtida foi

$$y = 0,6816x + 0,0022 \quad (\text{Equação 10})$$

e estima adequadamente as concentrações de carboidratos totais a partir dos valores de absorbância.

Figura 15: Curva padrão da glicose (mg/mL)



Foram observados que apesar dos métodos T1 e T4 propiciarem uma recuperação de massas superiores à 9%, os teores de carboidratos foram contrastantes. Em T1 a concentração de carboidratos foi de 84,63%, enquanto T4 o teor de carboidrato foi de 46,38%,

significativamente inferior a T1, desta maneira o teor global de T1 foi de 8,42% e de T4 foi de 4,28% (Tabela 1).

O método de extração T5, assim como T1, apresentou um rendimento maior (97, 94%), porém a quantidade de massa obtida no processo foi inferior aos demais métodos (1,58%) gerando assim um rendimento global de 1,55% (Tabela 1).

O método T3 apresentou a menor extração de carboidratos (17,22%) obtendo assim o menor rendimento global (1,28%). O método T2 apresentou um rendimento de carboidratos de 52,31%, e obteve um rendimento global de 2,17% (Tabela 1).

Comparando as extrações que utilizam NaOH com o tratamento T5 observamos que, apesar destes tratamentos aumentarem a obtenção da massa total, a quantidade de impurezas aumenta.

Tabela 1: Valores de carboidratos solúveis (mg.g⁻¹) totais da kefirana e seus respectivos rendimentos globais.

Métodos de Extração	Carboidratos (%)	Rendimento Global (%)
T1	84,63 ± 4 ^a	8,42
T2	52,31 ± 3 ^b	2,17
T3	17,22 ± 5 ^d	1,28
T4	46,38 ± 3 ^c	4,28
T5	97,94 ± 4 ^a	1,55

Diferentes letras em uma mesma coluna correspondem a valores com diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05).

5.3 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS

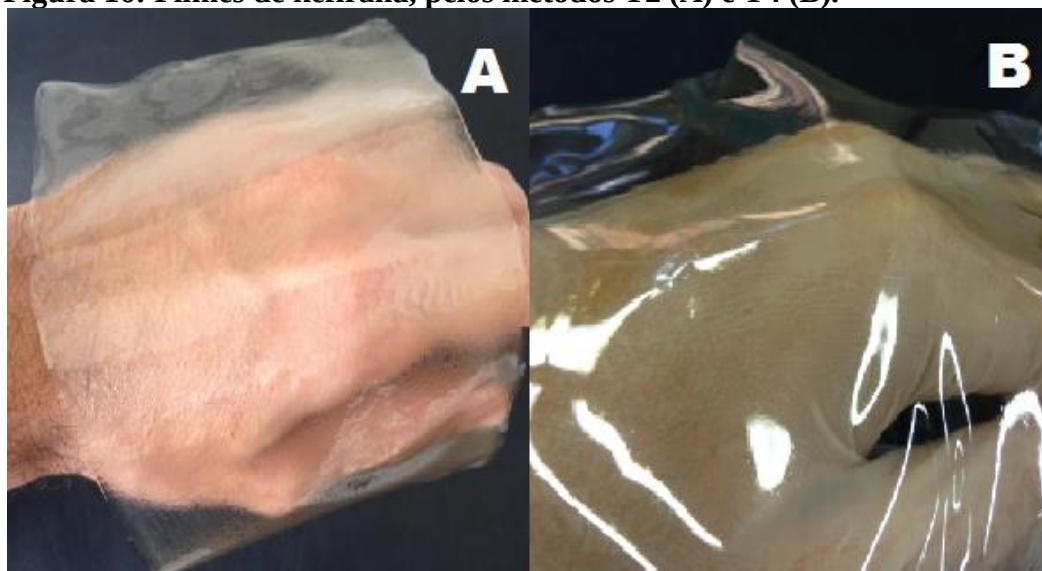
Devido ao baixo rendimento obtido, filmes do método de extração T5 não foram elaborados pois não haveria matéria-prima suficiente para os ensaios. Os polissacarídeos obtidos pelo método T1, T2, T3 e T4 se mostraram praticamente insolúveis em água, sendo necessário cerca de 7 dias para a dissolução em água quente (cerca de 7 dias a 100°C por 12 horas/dia). Devido a estas dificuldades na obtenção do filme, foi desenvolvido um novo método, baseado nos experimentos de PIERMARIA et al. (2011). Neste experimento, a solução aquosa foi substituída pela adição de NH₄OH para solubilização do polímero.

Mesmo utilizando NH₄OH o polímero do tratamento T1 foi de difícil dissolução no solvente para formação de filme, gerando, eventualmente, filmes de modo não reprodutível e devido a este fato estes foram excluídos das análises posteriores. Os polímeros do método T3

apresentaram baixo rendimento global e baixo teor de carboidrato, sendo também excluídos no processo de preparação dos filmes.

Os filmes de kefirana T2 e T4 apresentaram-se macroscopicamente homogêneos, sem rachaduras e flexíveis, sendo removidos das placas facilmente (Figura 8). Assim como nos filmes de kefirana produzidos por PIERMARIA et al. (2011), a adição de glicerol levou a obtenção de filmes flexíveis. Resultados semelhantes com filmes de kefirana foram encontrados também por ZOLFI et al. (2014a), MOTEDAYEN, KHODAIYAN, SALEHI (2013) e GHASEMLOU et al. (2011). Sendo assim foram escolhidos os métodos T2 e T4 para prosseguir nos testes de comparação, por apresentarem melhores resultados dentre os outros métodos na formulação do filme de kefirana (Figura 16).

Figura 16: Filmes de kefirana, pelos métodos T2 (A) e T4 (B).

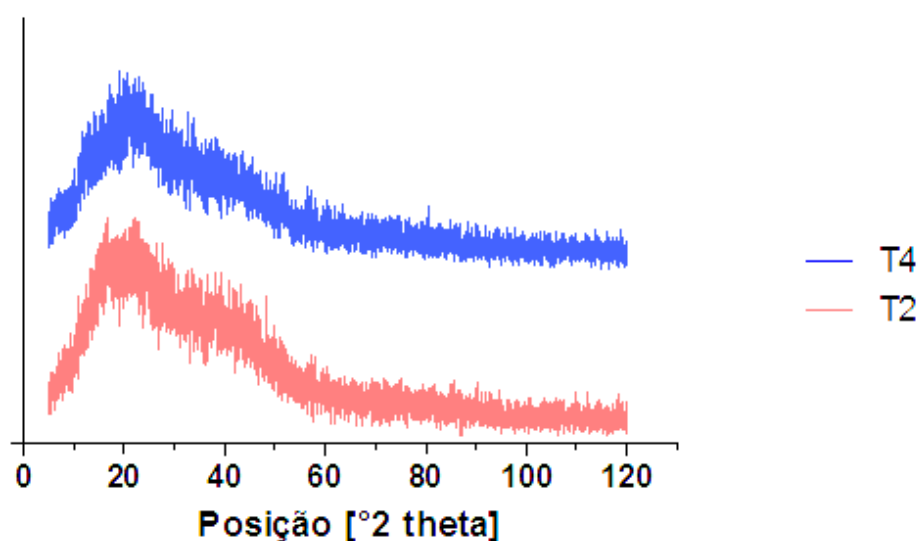


5.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE KEFIRANA

Sabe-se que uma estrutura cristalina tem redes cristalográficas bem definidas e que pelo método de difração de Raios X pode-se identificar por análise de difração de Bragg os elementos que formam o material. Quando os feixes de Raios-X não conseguem ultrapassar as franjas de espaçamentos formados pelos átomos dos planos cristalográficos de forma a estabelecer picos bem definidos, dizemos que a estrutura apresenta-se amorfa, ou seja, sem organização dos cristais, e impossível de definir qualitativamente os elementos (MARIANO, MAY, KURI, 2004). As amostras foram caracterizadas por difração de Raios X no equipamento

do Departamento de Física da UFPE (Figura 17). Nesta análise, o difratograma indicou a ausência de picos definidos, com o aparecimento apenas de um pico largo, característico de estruturas sem ordenamento de longo alcance, sendo considerado amorfo nas amostras do polímero em pó. PIERMARIA et al. (2011) estudando amostras de kefirana também observaram difratogramas com características amorfas.

Figura 17: Difratometria de raios X da Kefirana

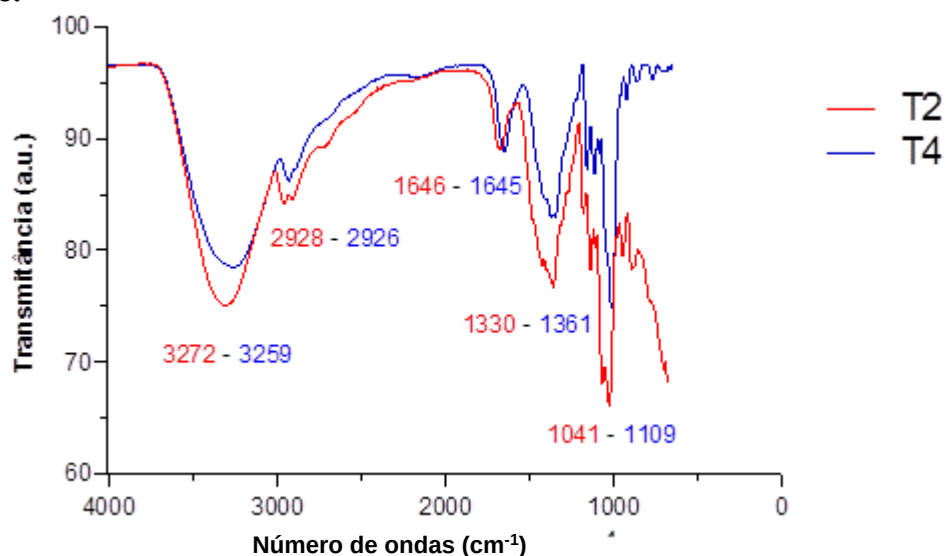


5.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DOS FILMES DE KEFIRANA

Os espectros na região do infravermelho dos filmes T2 e T4, apresentaram máximos de absorção que confirmaram os dados previstos para polímeros à base de kefirana. Observou-se os máximos em 3250 e 3272 cm^{-1} nos espectros dos filmes 1 e 2 respectivamente, que são atribuídas à deformação axial de grupamento hidroxila (O-H) dos polímeros. As bandas localizadas em 2923 e 2852 cm^{-1} no filme 1 e 2928 cm^{-1} no filme 2 referem-se à deformação axial simétrica e assimétrica de C-H em grupos funcionais metileno (CH_2). Os máximos apresentados em 1740 e 1646 cm^{-1} nos filmes 1 e 2 respectivamente, são atribuídas à deformação angular de O-H das moléculas de água presentes nos polímeros. As bandas localizadas em 1490 e 1330 cm^{-1} nos filmes 1 e 2 referem-se a deformação angular de C-H de grupos metilenos (CH_2). Observou-se também dois máximos de absorção a 1015 cm^{-1} para o filme 1 e 1041 cm^{-1} para o filme 2 atribuídas à deformação angular de C-O-C dos anéis dos

carboidratos presentes na estrutura dos polímeros, e aos grupamentos laterais C-OH e C-H (Figura 18).

Figura 18: Gráfico referente ao espectro de FTIR dos filmes pelo método 1 e 2 e simultâneo.



Os filmes apresentaram uma banda intensa e alargada na região de 3000 cm^{-1} e outra banda forte em torno de 1000 cm^{-1} . Segundo WANG et al., (2008), polissacarídeos contêm um número significativo de grupos hidroxila, exibindo uma banda alargada na região de 3000 cm^{-1} . Além disso, a presença de hidratos de carbono está associada aos máximos na região entre 1250 e 1000 cm^{-1} , tratando-se da região de impressão digital (região abaixo de 1500 cm^{-1}), confirmando que as substâncias estudadas se tratam, de polissacarídeos (Tabela 2).

Tabela 2: FTIR janelas espectrais e atribuições às bandas.

Janela	Número de ondas (cm ⁻¹)	Atribuição às bandas	Referências ^a
J ₁	3272 e 3259	Deformação axial de grupamento hidroxila (O-H) dos polímeros. (Ligação forte ou altamente forte de hidrogênio).	(2), (3), (4), (5), (6), (9), (11), (12)
J ₂	2928 e 2926	Deformação axial simétrica e assimétrica de C-H em grupos funcionais metileno (CH ₂).	(1), (2), (4), (9), (10), (12)
J ₃	1646 e 1645	O-H em moléculas de água com grupos moderadamente forte em H-ligado.	(3), (5), (7)
J ₄	1330 e 1361	Deformação angular de C-H de grupos metilenos (CH ₂).	(4), (5)
J ₅	1041 e 1109	Deformação angular de C-O-C dos anéis dos carboidratos presentes na estrutura dos polímeros, e aos grupamentos laterais C-OH e C-H.	(4), (5), (7), (8), (9)

^a (1) GU, WU (2007); (2) HELM, et al. (1991); (3) MARECHAL, CHAMEL (1996); (4) NATARAJ et al. (2008); (5) NAUMANN (2000); (6) PENG, SIESLER (2003); (7) SHEN, WU (2003); (8) SYNITSYA, et al. (2003); (9) WANG et al. (2008); (10) WOLKERS, et al. (2004); (11) WU, SIESLER (2003); (12) ZHANG, HAN (2006).

5.6 ESPESSURA

Os filmes de kefirana apresentaram variação de espessura entre 0,03 mm a 0,05 mm como demonstra a Tabela 3.

Tabela 3: Resultados da espessura dos filmes de kefirana dos métodos de extração 1 e 2.

Filmes de Kefirana	Espessura (mm)
T2	0,05±0,013 ^a
T4	0,03±0,015 ^b

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão. Diferentes letras em uma mesma coluna correspondem a valores com diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05) (PIMENTEL GOMES, 1990).

O filme feito pelo método T2 apresentou-se mais espesso em comparação ao método T4, apresentando uma diferença estatística significativa. ZOLFI et al., (2014b), em seus filmes de kefirana encontrou variação média de 0,074 a 0,076 mm, MOTEDAYEN, KHODAIYAN, SALEHI, (2013), encontrou uma variação de 0,057 a 0,074 mm e GHASEMLOU, KHODAIYAN, OROMIEHIE (2011b), variou entre 0,058 a 0,067 mm.

Segundo PIRES, MORAES (2012), substitutos de pele são geralmente mais finos do que a derme humana, cuja espessura varia de 0,5 mm a 2 mm, dependendo da idade, gênero e área do corpo. Sendo assim, considerando este aspecto, os filmes preparados neste trabalho possuem potencial para serem utilizados como curativos cutâneos.

5.7 TRANSPARÊNCIA

Em relação à transparência, os filmes apresentaram diferença estatisticamente significante entre as formulações ($p < 0,05$) (Tabela 4). O filme T2 apresentou-se com menor transparência, de acordo com o espectro de 400 a 800nm em relação a T4 (Figura 19).

Figura 19: Transparência dos filmes de kefirana dos métodos de extração T2 e T4.

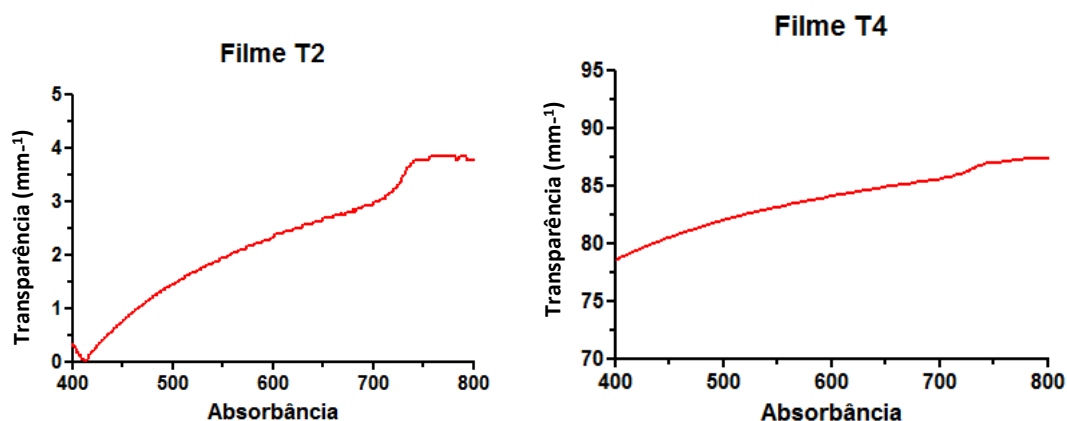


Tabela 4: Transparência dos filmes de kefirana dos métodos de extração T2 e T4.

Filmes de Kefirana	Transparência a $A_{420\text{nm}} \cdot \text{mm}^{-1}$	Transparência a $A_{600\text{nm}} \cdot \text{mm}^{-1}$	Transparência a $A_{800\text{nm}} \cdot \text{mm}^{-1}$
T2	0,18	2,32	3,80
T4	78,50	84,09	87,10

A transparência do filme na absorvância de 600 nm, pelo método de extração T2 foi de $2,32 A_{600\text{nm}} \cdot \text{mm}^{-1}$, valor este que se próxima ao encontrado no filme de kefirana produzido por PIERMARIA et al. (2009) onde os autores verificaram $2,71 A_{600\text{nm}} \cdot \text{mm}^{-1}$. FERREIRA et al., (2014), obteve uma transparência com filmes de FucoPol de $3,67 \pm 0,57 A_{600\text{nm}} \cdot \text{mm}^{-1}$. O valor encontrado no método de extração T2 é superior ao obtido para filmes de outros biopolímeros, tais como quitosana $1,13 \pm 0,05 A_{600\text{nm}} \cdot \text{mm}^{-1}$ e gelatina $0,67 \pm 0,01 A_{600\text{nm}} \cdot \text{mm}^{-1}$, apesar de ser menor do que o amido $4,0 \pm 0,1 A_{600\text{nm}} \cdot \text{mm}^{-1}$, amido de mandioca $4,7 \pm 0,1 A_{600\text{nm}} \cdot \text{mm}^{-1}$, ou o

amido de milho $4,6 \pm 0,1 \text{ A}_{600\text{nm}}.\text{mm}^{-1}$ (LÓPEZ, GARCÍA, 2014). O valor de transparência desses filmes, exceto o filme do método de extração T4, é semelhante ao valor obtido para alguns filmes sintéticos, como o polietileno de baixa densidade 3,05 (LI et al., 2013).

O valor de transparência do filme T4 foi de $84,09 \text{ A}_{600\text{nm}}.\text{mm}^{-1}$, ZOLFI et al., (2014a), encontrou transparência semelhante em filmes de kefirana em leite de aproximadamente $93,99 \text{ A}_{600\text{nm}}.\text{mm}^{-1}$, enquanto que apresentou uma pequena alteração após a incorporação de nanopartículas de montmorilonita (MMT) e nano-TiO₂, a transparência atingiu um nível mínimo $54,85 \text{ A}_{600\text{nm}}.\text{mm}^{-1}$ a uma concentração de 5% de TiO₂ de nanopartículas.

O filme T2 obteve menor transparência próxima da absorbância de 420 nm, $0,18 \text{ mm}^{-1}$, e maior transparência próxima da absorbância de 800 nm, $3,8 \text{ mm}^{-1}$. Em relação ao filme T4 este obteve menor transparência próximo da absorbância de 420 nm, $78,5 \text{ mm}^{-1}$, e maior transparência próxima da absorbância de 800 nm, $87,1 \text{ mm}^{-1}$ (Tabela 4).

5.8 TEOR DE UMIDADE

A (Tabela 5) apresenta os resultados de teor de umidade, referentes à caracterização físico-química dos filmes.

Tabela 5: Teor de umidade dos filmes de kefirana dos métodos de extração 1 e 2.

Filmes de Kefirana	Teor de Umidade (%)
T2	$24,62 \pm 0,223^a$
T4	$55,17 \pm 0,445^b$

Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras em uma mesma coluna correspondem a valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O filme T2 apresentou teor de umidade menor em relação ao filme T4, sendo essa estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

PIERMARIA et al., (2009), desenvolvendo filmes de kefirana, encontrou valores de umidade variando de 14,76% a 36,39%. GHASEMLOU et al., (2011), também trabalhando com filmes de kefirana encontrou o teor de umidade variando entre 17,95% e 37,04%. Foi referido pelos autores que o aumento progressivo no teor de umidade foi devido ao aumento da concentração do agente plastificante, que atuou como agente de retenção de água. ZOLFI et al., (2014b) encontrou em filmes de kefirana valores de umidade variando de 20,94% a 34,35%. SEYEDI et al. (2014) em seus filmes poliméricos de *Lepidium perfoliatum* encontrou valores

que aumentavam de acordo com a concentração de glicerol, onde o teor de umidade variou de 23,21% a 37,66%.

5.9 ÂNGULO DE CONTATO

YUAN, LEE (2013) afirmam que o tema molhamento despertou um enorme interesse nos últimos anos tanto pela pesquisa básica como aplicada. Estes destacam o importante papel na pesquisa de processos industriais como recuperação de óleo de lubrificação, revestimento e tecnologias de impressão. Os mesmos autores ressaltam ainda que existe um interesse crescente no estudo de superfícies super-hidrofóbicas devido as suas potenciais aplicações em superfícies auto-limpantes, nanofluidos e eletromolhamento. A interação biomaterial e fluidos corpóreos se constitui um dos elementos chave para uma biocompatibilidade adequada.

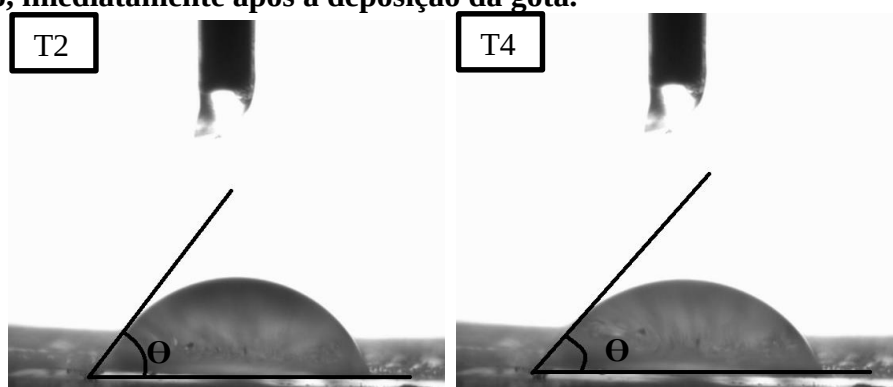
Estudos de molhabilidade geralmente envolvem a medição de ângulos de contato, estes indicam o grau de umedecimento na interação sólido e líquido. Ângulos de contato pequeno (menores de 90°) correspondem a alta molhabilidade, enquanto ângulos de contato grande (maiores de 90°) correspondem a uma baixa molhabilidade (YUAN, LEE, 2013).

SANTOS (2005) trabalhando com filmes poliméricos densos formados por acetato de celulose (AcC) e polihidroxialcanoato de cadeia média PHAmcl, com diferentes concentrações relativas de cada polímero obtiveram ângulos de contato que variavam entre 50° a 90°. VASCO (2014). Observaram também que o efeito da irradiação gama sobre compósito de fibras de Sisal / poliuretana determinou ângulos de contato que variavam entre $72 \pm 5^\circ$ a $80 \pm 4^\circ$.

Em relação a kefirana, GHASEMLOU et al., (2011) desenvolveram filmes utilizando ácido oleico e Tween-80 com o objetivo de diminuir a permeabilidade dos filmes a gases, os autores observaram uma maior hidrofobicidade a medida que o ácido oleico foi adicionado sendo que na dose máxima testada (35%) foi observado um ângulo de 110,48°. SHAHABI-GHAHFARROKHI et al., (2015). Ao irradiarem filmes de kefirna, obtiveram valores de ângulo de contato entre 92,57° e 114,0°. Em ambos os trabalhos, a obtenção da kefirana foi realizada a partir de kefir de leite com um método de extração utilizando água quente, o que diverge dos métodos utilizado neste trabalho.

O filme T2 obteve um ângulo de contato de aproximadamente de $47^\circ \pm 6$, enquanto que T4 obteve um ângulo de contato de aproximadamente $45^\circ \pm 8$ (Figura 20). Pelos critérios citados anteriormente, ambos os filmes de kefirana estudados apresentam comportamento hidrofílico. Em relação a aderência celular, estas preferem superfícies polares que possuem grupos funcionais hidrofílicos (ASSIS, BRITTO, 2014).

Figura 20: Perfis das gotas de água nos filmes T2 e T4, obtidos através do goniômetro, imediatamente após a deposição da gota.



5.10 RESISTÊNCIA À TRAÇÃO

Os dados dos ensaios de resistência à tração (Tabela 6) foram obtidos a partir de gráficos de tensão x deformação.

Tabela 6: Tensão de ruptura e deformação de ruptura dos filmes.

	Tensão de Ruptura (MPa)	Alongamento na Ruptura (%)
Filme T2	$1,3 \pm 0,02^a$	$63,06 \pm 0,26^a$
Filme T4	$4,89 \pm 0,06^b$	$111,99 \pm 0,35^b$

Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras em uma mesma coluna correspondem a valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os plastificantes podem interferir com as interações das cadeias poliméricas, através da diminuição das forças intermoleculares, que suavizam a rigidez da estrutura do filme e aumenta a mobilidade do polímero; isso diminui a resistência à tração e aumenta alongamento na ruptura

(LECETA, GUERRERO, DE LA CABA, 2013). De acordo com JOUKI et al., (2013), o teor de glicerol crescente aumenta a elasticidade do filme e o alongamento porque limita o estabelecimento de pontes de hidrogênio entre as cadeias poliméricas, aumentando assim o espaçamento intermolecular e, portanto, a mobilidade da cadeia. O teor de água dos filmes quando glicerol é adicionado, também afeta a resistência à tração e alongamento na ruptura, e acentua o efeito do teor de glicerol (ZIANI et al., 2008).

MOTEDAYEN, KHODAIYAN, SALEHI (2013), encontrou em seus filmes de kefirana/amido valores de tensão de ruptura que variaram entre 2,71 – 4,78 MPa. Já os filmes de kefirana de ZOLFI et al., (2014a), variaram entre 3,56 – 6,54 Mpa. FERREIRA et al., (2014), em seus filmes de FucoPol de galactomananas encontrou tensão de ruptura de seus filmes de $3,1 \pm 0,3$ MPa, segundo ele as propriedades mecânicas dos filmes de polissacarídeos são fortemente dependentes não só das características do biopolímero utilizado, mas também por adição de plastificantes, agentes de reticulação e outros aditivos na formação de filmes, bem como no teor de água da matriz polimérica, durante as medições. Este fato torna difíceis de comparar as propriedades mecânicas dos filmes obtidos em diferentes obras. Ainda assim, pode-se perceber que a tensão de ruptura encontra neste trabalho foi semelhante aos encontrados em outros autores.

Segundo YOSHIDA (2002), o tamanho, o número de carbonos na cadeia e o número de hidroxila funcionais nas moléculas de plastificante influenciam as propriedades mecânicas, favorecendo as ligações com as moléculas de água, que atua como plastificante na matriz filmogênica, aumentando a porcentagem de alongação e diminuindo a tensão na ruptura. No caso do glicerol, o tamanho pequeno em sua molécula facilita a sua inserção no meio das cadeias dos biopolímeros exercendo conseqüentemente maior influência nas propriedades mecânicas desses. Os grupos polares (-OH) ao longo das moléculas dos plastificantes desenvolvem as interações tipo plastificante-polímero em substituição às interações polímero-polímero nos biopolímeros (SEBIO, 2003).

Os filmes de kefir apresentam valores muito elevados de alongamento, mais elevado, por exemplo, do que filmes de celofane (20%) e poliestireno (1%), mas não possui a ductilidade apresentada pelo LDPE (500%), GHASEMLOU et al., (2011).

PIERMARIA et al. (2009), encontrou valores de alongamento de $116.69 \pm 14,48\%$ semelhante a técnica do filme 2, já CERQUEIRA et al. (2012), encontrou um alongamento de $38,7 \pm 3,8\%$ em biofilmes de galactomanana. RIVERO, GARCÍA, PINOTTI (2009), em seus filmes de gelatina encontrou um alongamento de $190 \pm 0,35\%$. E por fim GHASEMLOU, KHODAIYAN, OROMIEHIE (2011), encontrou valores que variavam de 50.73 ± 10.60 a

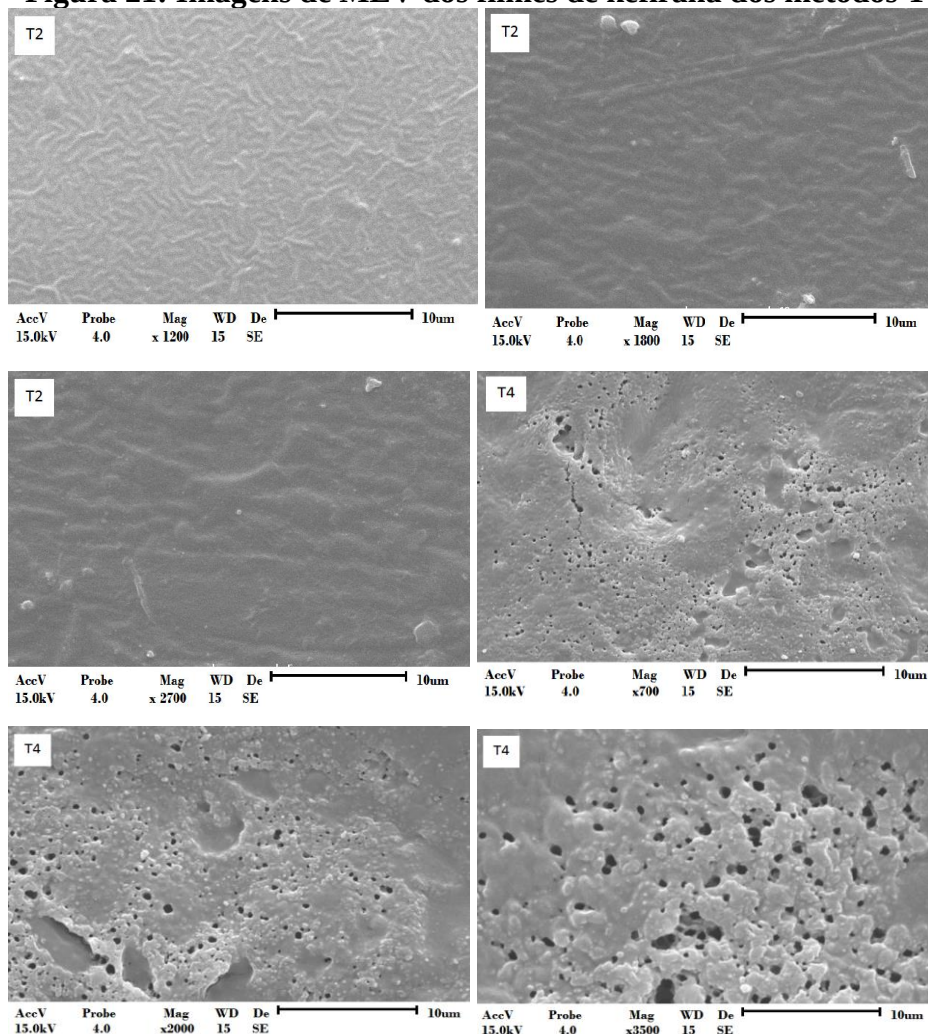
162.45 $\pm$ 6.09% em seus filmes de kefirana, valores esses que corroboram com o presente estudo.

MALI et al., (2002), demonstrou que variabilidade nos testes mecânicos pode ser controlada pela obtenção de uma espessura constante, porém segundo a mesma, a obtenção da uniformidade nos filmes pelo método de *casting* é mais complexa.

5.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO FILME DE KEFIRANA

As microestruturas analisadas por MEV dos filmes de kefirana dos métodos 2 estão apresentadas na (Figuras 21).

Figura 21: Imagens de MEV dos filmes de kefirana dos métodos T2 e T4



Os filmes apresentaram pequenas variações estruturais na sua superfície e sem rachaduras, o filme T4 apresentou estruturas irregulares semelhante a uma superfície porosa, o

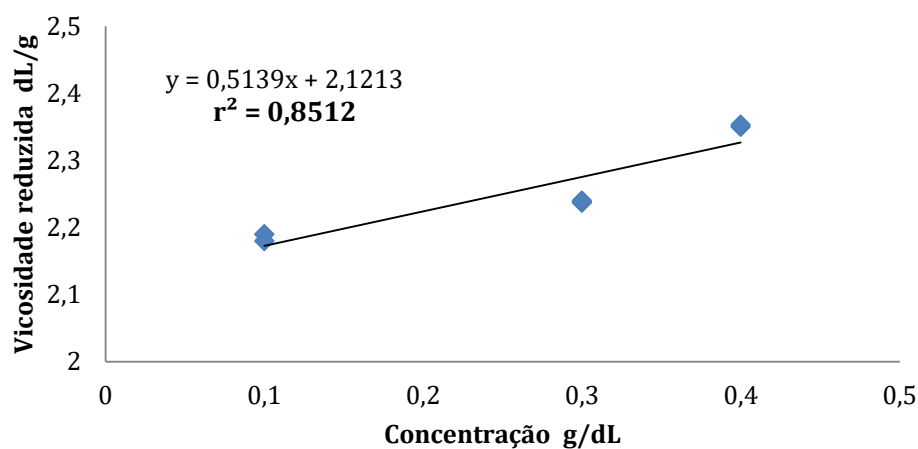
que pode facilitar a aderência celular. PIERMARIA et al. (2009) e PIERMARIA et al. (2011), produziu filmes de kefirana plastificados com glicerol, a partir de um método diferente do utilizado neste trabalho, observando uma superfície lisa e compacta o que diferenciou do resultado deste trabalho. Entretanto, GHASEMLOU et al. (2011), utilizando o mesmo método de PIERMARIA et al. (2009), obteve filmes de kefirana plastificados com glicerol, sem apresentar rachaduras, mas com pequenas variações estruturais na sua superfície, em relação ao filme de kefirana sem plastificante, que apresentou estrutura homogênea.

5.12 ANÁLISES VISCOSIMÉTRICAS

O método de Huggins é o método tradicional para se determinar a viscosidade intrínseca $[\eta]$. A maioria dos polímeros em solução segue essa relação linear entre a concentração e a viscosidade.

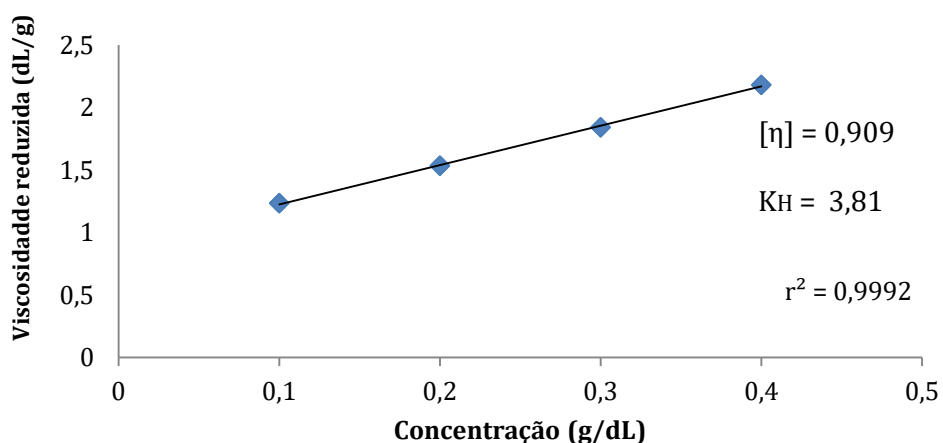
Em um primeiro ensaio realizado, utilizou-se o polímero extraído pelo método T4 em solução de hidróxido de sódio. O coeficiente de determinação obtida neste ensaio foi de $r^2 = 0,8512$, indicando correlação insuficiente entre a viscosidade intrínseca e a concentração (Figura 22). A hipótese para explicar o baixo valor de r^2 obtido foi a provável quebra de cadeias poliméricas causada pela utilização de uma base forte (NaOH). Esta hipótese se assemelha ao comportamento já descrito para a quitosana onde a mesma somente dissolve em meio solução diluída de ácido fraco (eg. Ácido acético), porém quando esta é submetida a soluções concentradas de ácidos fracos ou soluções de ácidos fortes sofre degradação.

Figura 22: Ensaio de correlação utilizado para o cálculo da constante de Huggins com kefirana extraída do método T4 em solvente NaOH.



Em um segundo ensaio, afim para determinação da constante de Huggins o polissacarídeo de T4 foi dissolvido em água (cerca de 7 dias a 100°C por 12 horas/dia). Neste ensaio foi determinado um coeficiente de determinação satisfatório ($r^2 = 0,9992$) e obteve-se um valor de 3,8 para a constante de Huggins e uma viscosidade intrínseca de 0,909 dL/g (Figura 23).

Figura 23: Ensaio de correlação utilizado para o cálculo da constante de Huggins com kefirana extraída do método T4 em água.



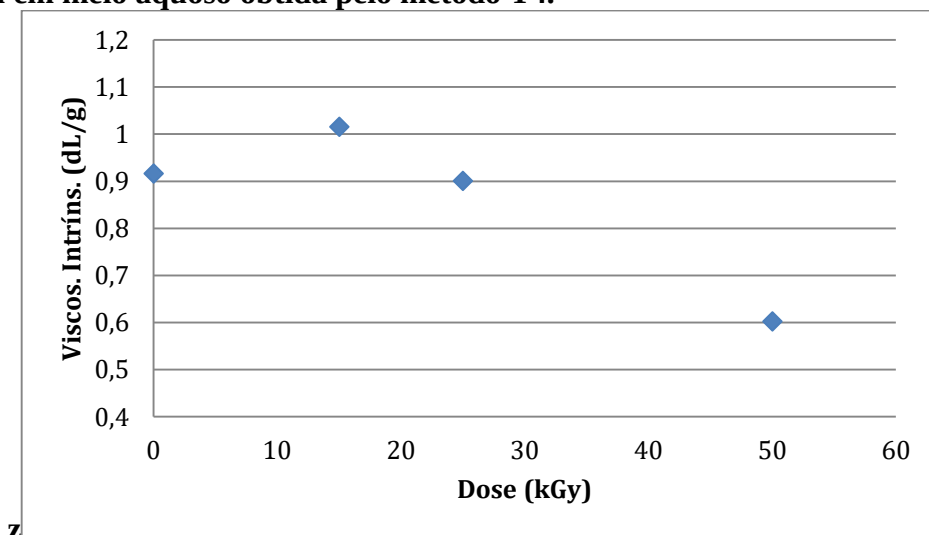
A dificuldade na interpretação da constante de Huggins para moléculas de polímeros é mais acentuada devido à interpenetração da cadeia polimérica. A extensão desta penetração é uma função das interações polímero-polímero e polímero-solvente, que afetam a interação

hidrodinâmica intramolecular e as dimensões moleculares (GÜNER, 1996). PIERMARIA, DE LA CANAL, ABRAHAM, (2008) encontrou uma constante de Huggins de 6,0 dl/g em seus experimentos com outro tipo de extração do polímero, valor este que se assemelha ao encontrado neste trabalho.

Em relação ao ensaio de radiação gama a radiólise da Kefirana, induzida pela radiação gama do Co-60, provoca os efeitos de reticulação e cisões da cadeia principal simultaneamente. Entretanto, em doses até 15k Gy, o efeito predominante é a reticulação entre cadeias que consequentemente aumenta a sua massa molar, evidenciada pelo acréscimo na viscosidade intrínseca do material. Por outro lado, em doses igual e acima de 25 kGy, as cisões na cadeia principal predomina sobre a reticulação, conforme mostra a Figura 24. Vale lembrar que a viscosidade intrínseca de um material polimérico está diretamente relacionada com a massa molar, por meio da relação de Mark-Howink: $[\eta] = k.Mv.a$. Onde, k e a são constantes que dependem do sistema polímero-solvente-temperatura.

Esse comportamento também foi observado no policarbonato lexan, em que a reticulação é predominante em doses até 40 KGy. Acima desta dose ocorre cisões na cadeia principal do polímero (ARAÚJO et al., 1999).

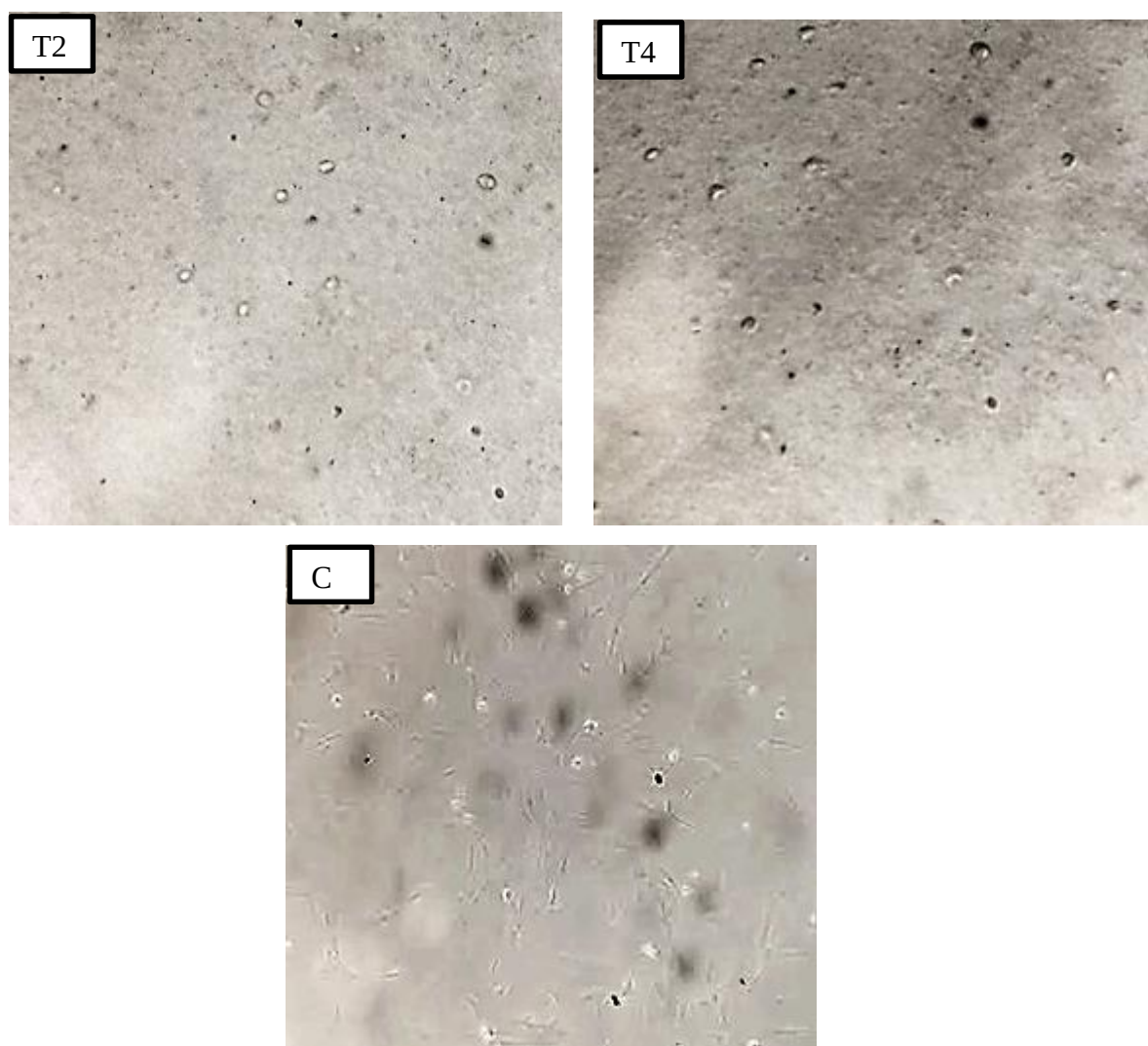
Figura -24 Efeito da radiação gama sobre a viscosidade intrínseca de kefirana dissolvida em meio aquoso obtida pelo método T4.



5.13 AVALIAÇÃO DOS FILMES DE KEFIRANA PARA CULTIVO CELULAR

As colônias de células começaram a aparecer nas placas de cultura em aproximadamente 72 horas. Após cinco dias de cultura, o número e densidade de colônias de células aumentaram lentamente. As células mantidas em cultura em ambos os filmes (T2 e T4) aderiram parcialmente, embora em menor número em relação ao controle (Figura 25). Entretanto, a área média ocupada pelas células mesenquimais conforme analisada pela morfometria foi similar tanto para T2 quanto para T4.

Figura 25: Microfotografia das células tronco mesenquimais em cultura nos filmes T2 e T4.



C é o controle sem filme, T2 representa o filme da extração T2 e T4 representa o filme da extração T4.

Os resultados demonstraram que é possível obter filmes de kefirana para serem usados como suporte de crescimento celular. Isto foi possível devido às propriedades biocompatíveis da kefirana, independentemente do protocolo utilizado de extração neste trabalho (T2 ou T4). Não há relatos na literatura do uso de filmes de kefirana como suporte de cultivo celular, sendo este ramo promissor para trabalhos futuros.

6 CONCLUSÃO

Foram feitos vários ensaios de extração (T1, T2, T3, T4 e T5), com rendimento e teor de carboidrato diferente. O fator decisivo para a escolha dos métodos T2 e T4 foi à capacidade de formulação dos filmes e sua reprodutibilidade, embora T1 tenha se mostrado uma técnica promissora.

Em comparação com os filmes T2 e T4, eles se mostraram macroscopicamente homogêneos, sem rachaduras e flexíveis. T4 obteve menor espessura ($0,03 \pm 0,005$ mm), maior teor de umidade ($55,17\% \pm 0,445$), transparência ($84,09\% \pm 0,51$), tensão de ruptura ($4,89 \text{ MPa} \pm 0,06$), alongamento de ruptura ($111,99\% \pm 0,35$) e rendimento global ($4,28\%$), porém T2 obteve um maior teor de carboidrato ($52,31\% \pm 0,03$) em relação a T4 ($46,38\% \pm 0,03$). Através do ângulo de contato foi possível observar que a superfície dos filmes T2 e T4 era hidrofílica.

Foi realizada análise por MEV dos filmes T2 e T4, que apresentam pequenas variações estruturais na sua superfície e sem rachaduras, com T4 apresentando estruturas semelhantes a poros, e através da análise de DRX foi possível verificar o comportamento amorfo do polímero em ambas extrações.

A natureza química do material (dos filmes) foi confirmada pela análise espectroscópica na região do Infravermelho, sendo os grupos encontrados O-H; C-H (CH_2) e C-O-C.

Nas análises viscosimétricas foi possível observar através do método de Huggins que a relação polímero (kefirana) / solvente (hidróxido de sódio) não obteve uma linearidade esperada, tendo que mudar o solvente para água e desta forma pode-se perceber que a kefirana obedece assim como a maioria dos polímeros uma relação linear com $K_H \sim 3,8$.

A irradiação gama na kefirana, provocou os efeitos de reticulação (até 15 KGy) e cisões (a partir de 15 KGy) na cadeia principal dependendo da dose irradiada.

No teste de adesão celular em que células mesenquimais de cordão umbilical foram cultivadas sobre a superfície do polímero, observou-se que houve uma adesão parcial em ambos os filmes.

7 PERSPECTIVAS

Objetiva-se realizar análises de Ressonância Magnética Nuclear a fim se obter um melhor conhecimento sobre sua estrutura, bem como, realizar análises térmicas, tais como Termogravimétrica (TGA) de análise térmica diferencial (DTA). Aprimorar a técnica T1 que se mostrou promissora no rendimento global. Realizar novos testes de cultura de células, para avaliação de uma eventual citotoxicidade e mutagenicidade dos filmes. Realizar ensaios com radiação para verificar o comportamento do polímero frente a radiação gama, bem como testes de biodegradabilidade dos filmes. Realizar ensaios mecânicos para análise para kefirana irradiada com dose de 25 kGy. Realizar ensaios viscosimétricos com as outras extrações do polímero. Montar uma estrutura tridimensional para cultivo celular dos filmes apresentados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. **Innate immunity** in: Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Saunders, Philadelphia p. 289-292, 2000.
- ALBUQUERQUE, P. B., BARROS, W., SANTOS, G. R., CORREIA, M. T., MOURÃO, P. A., TEIXEIRA, J. A., CARNEIRO, M. G. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. **Carb. Pol.** v. 104, p. 127-134, 2014.
- ANDERSON, J. M. Multinucleated giant cells. **Curr. Opin. Hemat.** v. 7, p. 40-47, 2000.
- ANDERSON, J. M. Biological responses to materials. **Ann. Rev. Mater. Res.** v. 31, p. 81-110, 2001.
- ANDERSON, J. M., SCHOEN, F. J. **Interactions of blood with artificial surfaces**. In: Butchart, E.G., Bodnar, E. eds. Current Issues in Heart Valve Disease: Thrombosis, Embolism and Bleeding, eds. ICR Publishers, p. 160–171, 1992.
- ARAUJO, E. S., KHOURY, H. J., SILVEIRA, S. V. Effects of gamma-irradiation on some properties of durolon polycarbonate. **Radiat. Phys. Chem.** v.53, p. 79-84, 1999.
- ASSIS, O. B. G., BRITO, D. Coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Braz. J. Food Technol.** v. 17, p. 87-97, 2014.
- AVELLA, M., VLIEGER, J. J., ERRICO, M. E., FISCHER, S., VACCA, P., VOLPE, M. G. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. **Food Chem.** v. 93, p. 467–474, 2005.
- BASTOS, A. R M. **Caraterização dos polissacarídeos da parede celular de leveduras**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Alimentar, Universidade de Aveiro, Portugal. p. 44, 2013.
- BENJAMINI E., COICO R., SUNSHINE G. **Elements of innate and acquired immunity**. Immunology—a short course. New York: Wiley-Liss. p. 17–39, 2000.
- BHATIA, S. N., BALIS, U. J., YARMUSH, M. L., TONER, M. Effect of cell–cell interactions in prevention of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. **Faseb J.** v.13, p. 1883–1900, 1999.
- BIANCO, P., ROBEY, P. G. Stem cells in tissue engineering. **Nat.** v. 414, p. 118-121, 2001.
- BLAU, H. M., BRAZELTON, T. R., WEIMANN, J. M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? **Cell.** v. 105, p. 829–841, 2001.
- BOISSARD, C. I. R., BOURBAN, P. E., TAMI, A. E., ALINI, M., EGLIN, D. Nanohydroxyapatite/poly (ester urethane) scaffold for bone tissue engineering. **Act. Biomater.** v. 5, p. 3316-3327, 2009.
- BOKROS, J. C. Carbon biomedical devices. **Carbon.** v. 15, p. 353-371, 1977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Brasília. p. 46, 2007.

BRITTBERG, M. Autologous chondrocyte implantation—technique and long-term follow-up. **Injury**. v. 39, p. 40-49, 2008.

BRODBECK, W. G., VOSKERICIAN, G., ZIATS, N. P., NAKAYAMA, Y., MATSUDA T., ANDERSON, J. M. In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials is dependent on surface chemistry. **J. Biomed. Mater.** v. 64A, p. 320–329, 2001.

BUCIO, E., BURILLO, G. Radiation grafting of pH and thermosensitive N-isopropylacrylamide and acrylic acid onto PTFE films by two-steps process. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 76, p. 1724-1727, 2007.

CERQUEIRA, M. A., SOUZA, B. W., TEIXEIRA, J. A., VICENTE, A. A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films—A comparative study. **Food Hydro.** v. 27, p. 175-184, 2012.

CHAMBERLAIN, E. K., RAO, M. A. Effect of concentration on rheological properties of acid-hydrolyzed amylopectin solutions. **Food Hydro.** v. 14, p. 163-171, 2000.

CHEN, C. S., MRKSICH, M., SUANG, S., WHITESIDES, G. M., INGBER, D. E. Geometric control of cell life and death. **Sci.** v. 276, p. 1425–1528, 1997.

CHIU, J. J., CHEN, L. J., LEE, P. L., LEE, C. I., LO, L. W., USAMI, S., CHIEN, S. Shear stress inhibits adhesion molecule expression. in vascular endothelial cells induced by coculture with smooth muscle cells. **Blo.** v.101, p. 2667–2674, 2003

CHUN, S., KIM, S., JEONG, Y., KANG, I. K. Composite nanofiber mats consisting of hydroxyapatite and titania for biomedical applications. **Biom. Mat.** Research Part B: Applied Biomaterials. v. 94, p. 380-387, 2010.

COLTON, C. K. Implantable biohybrid artificial organs. **Cell Transp.** v. 4, p. 415–436, 1995.

CUQ, B., AYMARD, C., CUQ, J. L., GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. **Food Sci.** v. 60, n. 6, p. 1369-1374, 1995.

DENG, Y., YANG, G., YUE, J., QIAN, B., LIU, Z., WANG, D., ZHAO, Y. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. **Food Control.** v. 38, p. 184-191, 2013.

DIAS, F. S., QUEIROZ, D. C., NASCIMENTO, R. F., LIMA, M. B. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. Nota técnica. **Quím. Nov.** v. 31, p. 160, 2008.

DINIZ, R. O., PERAZZO, F. F., CARVALHO, J. C. T., SCHNEENEDORF, J. M. Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Farmac.** v.13, p. 19-21, 2003.

DUARTE, A. R. C., MANO, J. F., REIS, R. L. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. **Poly.** v. 45, p. 141-148, 2009.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analyt. Chem.** v. 28, p. 350-356, 1956.

FERREIRA, A. R., TORRES, C. A., FREITAS, F., REIS, M. A., ALVES, V. D., COELHO, I. M. Biodegradable films produced from the bacterial polysaccharide FucoPol. **Biol. Macrom.** v. 71, p. 111-116, 2014.

FRANCO, J., HUNGER, P., LAUNEY, M. E., TOMSIA, A. P., SAIZ, E. Direct write assembly of calcium phosphate scaffolds using a water-based hydrogel. **Act. Biomater.** v.6, p. 218-228, 2010.

FRIEDENSTEIN, A. J., GORSKAJA, J. F., KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp. Hematol.** v.4, p. 267-74, 1976.

FUCHS, J. R., NASSERI, B. A., VACANTI, J. P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. **Ann Thorac Surg.** v. 72 p. 577–590, 2001.

GALLIN, J. L., SNYDERMAN, R. **Wound repair: an overview.** Inflammation: Basic principles and clinical correlates. PMPH-USA. v.3, p. 865-881, 1999.

GARRIC, X., GUILLAUME, O., DABBOUE, H., VERT, M., MOLÈS, J. P. Potential of a PLA–PEO–PLA-Based Scaffold for Skin Tissue Engineering: In Vitro Evaluation. Polymer Edition. **Biomater. Sci.** v. 23, p. 1687-1700, 2012.

GARROTE, G. L., ABRAHAM, A. G., DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Dair. Res.** v.68, p. 639-652, 2001.

GELINSKY, M. **Mineralised collagen as biomaterial and matrix for bone tissue engineering.** In Meyer, U., Meyer, T., Handschel, J., Wiesmann, H. P. eds., *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Springer, Heidelberg and Berlin. p. 485–493, 2009.

GHASEMLOU, M., KHODAIYAN, F., OROMIEHIE, A. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefir. **Carbo. Poly.** v.84, p. 477–483, 2011.

GHASEMLOU, M., KHODAIYAN, F., OROMIEHIE, A., YARMAND, M. S. Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, a exopolysaccharide obtained from kefir grains. **Food Chem.** v.127, p. 1496–1502. 2011.

GOMES, A. A. S. **Otimização da Técnica de Extração e Caracterização de Xilana de Sabugo de Milho no Estado da Paraíba.** Monografia (Bacharel) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade da Paraíba. João Pessoa – PB. p. 19-20, 2014.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Act Mater.** v. 48, p. 263–277, 2000.

GRIFFITH, L. G., NAUGHTON, G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. **Sci.** v. 295, p. 1009–1014, 2002.

GU, W., WU, P. FT-IR and 2D-IR spectroscopic studies on the effect of ions on the phase separation behavior of PVME aqueous solution. **Analyt. Sci.** v. 23, p. 823-827, 2007.

GÜNER, A. Properties of aqueous salt solutions of polyvinylpyrrolidone. I. Viscosity characteristics. **Polym. Sci.** v. 62, p. 785-788, 1996.

GUZEL-SEYD, T., KOK-TAS, A. K. Functional properties of kefir. *Greene, Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* v. 51, p. 261–268, 2011.

HALLAB, N., MERRITT, K., JACOBS, J. J. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. **Bone Joint. Surg.** v. 83, p. 428-428, 2001.

HAN, J. H., FLOROS, J. D. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. **Plast. Sheet.** v. 13, p. 87–98, 1997.

HELM, D., LABISCHINSKI, H., SCHALLEHN, G., NAUMANN, D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Gener. Microb.** v. 137, p. 69-79, 1991.

HENCH, L. L. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. **Biom. Mat. Res.** v. 41, p. 511-518, 1998.

HENCH, L. L., POLLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Sci.** v. 295, p. 1014 - 1017, 2002.

HIRSCHI, K. K., GOODELL, M. A. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. **Gene Ther.** v. 9, p. 648-652, 2002.

HUANG, S., INGBER, D. E. Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. **Exp. Cell. Res.** v. 261, p. 91-103, 2000.

HUBBELL, J. A. Bioactive biomaterials. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 10, p. 123–129, 1999.

HUMES, H. D., BUFFINGTON, D. A., MACKAY, S. M., FUNK, A., WETZEL, W. E. Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney. **Nat. Biotechnol.** v. 17, p. 451–455, 1999.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomat.** v. 21, p. 2529-2543, 2000.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell.** v. 110, p. 673-687, 2002.

HYNES, R. O., ZHAO, Q. The evolution of cell adhesion. **Cell Biol.** v. 150, p. F89-F96, 2000.

JACOBS, J. J., ROEBUCK, K. A., ARCHIBECK, M., HALLAB, N. J., GLANT, T. T. Osteolysis: basic science. **Orthop. Relat. Res.** v. 393, p. 71-77, 2001.

JANEWAY, J. R., CHARLES, A., MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Immun. Rew.** v. 20, p. 197-216, 2002.

JOHANSSON, S. G. O., BIEBER, T., DAHL, R., FRIEDMANN, P. S., LANIER, B. Q., LOCKEY, R. F., WILLIAMS, H. C. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. **Aller. Clin. Immun.** v. 113, p. 832-836, 2004.

JOUKI, M., KHAZAEI, N., GHASEMLOU, M., HADINEZHAD, M. Effect of glycerol concentration on edible film production from cress seed carbohydrate gum. **Carbo. Polym.** v. 96, p. 39-46, 2013.

KARAGEORGIOU, V., KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomat.** v. 26, p. 5474-5491, 2005.

KRISHNAVENI, S., BALASUBRAMANIAN, T., SADASIVAM, S. Determination of Total Carbohydrate. **Food Chem.** v. 15, p. 229-12, 2009.

LANGER, R. Selected advances in drug delivery and tissue engineering. **J. Cont. Rel.** v. 62, p. 7-11, 1999.

LANGER, R., TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nat.** v. 428, p. 487- 492, 2004.

LANGER, R., VACANTI, J. P. Selected advances in drug delivery and tissue engineering. **J. Cont. Rel.** v. 62, p. 7-11, 1999.

LANZA, R., LANGER, R., VACANTI, J. P. **Principles of tissue engineering.** Academic press. AP 3^o. San Diego, California. p. 360, 2011.

LECETA, I., GUERRERO, P., DE LA CABA, K. Functional properties of chitosan-based films. **Carbo Polym.** v. 93, p. 339-346, 2013.

LI, Z., LIU, R., MAI, B., WANG, W., WU, Q., LIANG, G., ZHU, F. Temperature-induced and crystallization-driven self-assembly of polyethylene-b-poly (ethylene oxide) in solution. **Polym.** v. 54, p. 1663-1670, 2013.

LÓPEZ, M. A., GARCÍA, M. Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films containing chitin and chitosan. **Food Sci.** v. 57, p. 106-115, 2014.

MAEDA, H, ZHU, X, OMURA, K, SUZUKI, S, KITAMURA S. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. **Biofac.** v. 22, p. 197-200, 2004.

MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., GARCÍA, M. A., MARTINO, M. M., ZARITZKY, N. E. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbo. Polym.** v. 50, p. 379-386, 2002.

MARECHAL, Y., CHAMEL, A. Water in a biomembrane by infrared spectrometry. **Phys. Chem.** v. 100, p. 8551-8555, 1996.

MARIANO, N. A., MAY, J. E., KURI, S. E. Ligas Finemet nanocristalizadas a partir de precursores amorfos. **Esc. Min.** v. 57, p. 129-133, 2004.

MARK, J. E., ALLCOCK, H. R., WEST, R. **Inorganic polymers**. New York: Oxford University Press. v 2, p. 21, 2005.

MARTINS, A., CHUNG, S., PEDRO, A. J., SOUSA, R. A., MARQUES, A. P., REIS, R. L., NEVES, N. M. Hierarchical starch-based fibrous scaffold for bone tissue engineering applications. **Tis. Eng. Regen. Med.** v. 3, p. 37-42, 2009.

MCHUGH, D. J. **Production, properties and uses of alginates**, in: MCHUGH, D. J. ed Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fisheries Technical Paper. v. 288, p. 58-115, 1987.

MCNALLY, A. K., ANDERSON, J. M. $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation. **Amer. Jour. Pat.** v. 160, p. 621-630, 2002.

MITCHELL, R. N. Don't blame the lymphocyte: immunologic processes are not important in tissue valve failure. **J. Hea. Val. Dis.** v. 10, p. 467-470, 2001.

MORAES, I. C., CARVALHO, R. A., BITTANTE, A. M. Q., SOLORZA-FERIA, J., SOBRAL, P. J. Film forming solutions based on gelatin and poly (vinyl alcohol) blends: Thermal and rheological characterizations. **Food Eng.** v. 95, p. 588-596, 2009.

MOREIRA, M. E. C., SANTOS, M. D., ZOLINI, G. P. P., WOUTERS, A. T. B., CARVALHO, J. C. T., SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of a carbohydrate fraction isolated from sugary kefir. **Med. Food.** v. 11, p. 356-361, 2008.

MOTEDAYEN, A. A., KHODAIYAN, F., SALEHI, E. A. Development and characterisation of composite films made of kefir and starch. **Food Chem.** v. 136, p. 1231-1238, 2013.

MWALE, F., GIRARD-LAURIAULT, P. L., WANG, H. T., LEROUGE, S., ANTONIOU, J., WERTHEIMER, M. R. Suppression of genes related to hypertrophy and osteogenesis in committed human mesenchymal stem cells cultured on novel nitrogen-rich plasma polymer coatings. **Tis. Eng.** v. 12, p. 2639-2647, 2006.

NADAL-GINARD, B., KAJSTURA, J., ANVERSA, P., LERI, A. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. **Clin. Invest.** v. 111, p. 1457-1459, 2003.

NARAYAN, R. J. The next generation of biomaterial development. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci.** v. 368, p. 1831-1837, 2010.

NATARAJ, S., SCHOMÄCKER, R., KRAUME, M., MISHRA, I. M., DREWS, A. Analyses of polysaccharide fouling mechanisms during cross flow membrane filtration. **Memb. Sci.** v. 308, p. 152-161, 2008.

NAUMANN, D. **Infrared spectroscopy in microbiology**. In R. A. Meyer (Ed.), Encyclopedia of analytical chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. p. 102, 2000.

NECULA, B. S., FRATILA-APACHITEI, L. E., ZAAT, S. A., APACHITEI, I., DUSZCZYK, J et al. In vitro antibacterial activity of porous TiO₂ –Ag composite layers against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Acta Biomater.** v. 5, p. 3573-3580, 2009.

NEUBERGER, J. M. A bioartificial liver-state of the art. **Sci.** v. 295, p. 1005–1009, 2002.

NGUYEN, L. L., D'AMORE, P. A. Cellular interactions in vascular growth and differentiation. **Int. Rev. Cyt.** v. 204, p. 1-48, 2001.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. **Mat. Tod.** v. 14, p. 88–95, 2011.

ONOFRE, N. A. **Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ágar, agarose e kefirana com incorporação de nanopartículas de prata**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. p. 110, 2014.

ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M., MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Cultura Médica, Rio de Janeiro. v. 20, p. 51-64, 2006.

ORLIC, D., KAJSTURA, J., CHIMENTI, S., BODINE, D. M., LERI, A., ANVERSA, P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. **Ped. Transp.** v. 7, p. 86-88, 2003.

PAOLI, M. A. **Degradação e estabilização de polímeros**. São Paulo: Artliber. v 2, p. 2-6, 2009.

PARK, J. B., BRONZINO, J. D. **Biomaterials: principles and applications**. CRC Press, Boca Raton, FL., p. 55, 2003.

PENG, Y., WU, P., SIESLER, H. W. Two-dimensional/ATR infrared correlation spectroscopic study on water diffusion in a poly(3-caprolactone) matrix. **Biomacro.** v. 4, p. 1041-1044, 2003.

PETERSON, K. M., ALY, A., LERMAN, A., LERMAN, L. O., RODRIGUEZ-PORCEL, M. Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: role of oxidative stress. **Life Sci.** v. 88, p. 65-73, 2011.

PIERCE, G. F. Inflammation in nonhealing diabetic wounds: the space-time continuum does matter. **J. Pathol.** v. 159, p. 399–403, 2001.

PIERMARIA, J., BOSCH, A., PINOTTI, A., YANTORNO, O., GARCIA, M. A., ABRAHAM, A. G. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. **Food Hydro.** v. 25, p. 1261-1269, 2011.

PIERMARIA, J. A., DE LA CANAL, M. L., ABRAHAM, A. G. Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. **Food Hydro.** v. 22, p. 1520-1527, 2008.

PIERMARIA, J. A., PINOTTI A., M., GARCIA, A., ABRAHAM, A. G. Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. **Food Hydro.** v. 23, p. 684–690, 2009.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13.ed. Piracicaba: Nobel. p. 468, 1990.

PIRES, A. L. R., MORAES, A. M. **Avaliação do efeito do ph e da temperatura de secagem nas características de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata**. 7º Congresso Latino Americano de Biomateriais e Órgãos Artificiais. Natal. p. 6-8, 2012.

PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Sci.** v. 284, p. 143-7, 1999.

RABKIN, E., SCHOEN, F. J. Cardiovascular tissue engineering. **Cardiovasc. Pathol.** v. 11, p. 305, 2002.

RAMAKRISHNA, S., MAYER, J., WINTERMANTEL, E., LEONG, K. W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Sci. Tech.** v. 61, p. 1189-1224, 2001.

RBT. Registro Brasileiro de Transplante. **Veículo oficial da associação brasileira de transplante de órgãos**. Janeiro – Março de 2014. RBT. v. 20, p. 3, 2014.

RIMADA, P. S., ABRAHAM, A. G. Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. **Int. Dairy Jour.** v. 16, p. 33-39, 2006.

RIVERO, S., GARCÍA, M. A., PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Food Eng.** v. 90, n. 4, p. 531-539, 2009.

RIZZI J. **Potencial biotecnológico dos polissacarídeos de microalgas marinhas**. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. p. 17-18, 2010.

RODRIGUES, B. F. F. S. **Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto. p.69, 2012.

ROSEN, S. **Fundamental principles of polymeric materials**. New York: John Willey and Sons. v. 2, p. 298–316, 1993.

SANTOS, S. F. **Análise de filmes poliméricos densos de ACC/PHANMCL por técnicas de DSC, DMA, XPS, ângulo de contato e AFM**. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Física, PUC-RJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. p. 629-630, 2005.

SEBIO, L. **Desenvolvimento de plástico biodegradável a base de amido de milho e gelatina pelo processo de extrusão: Avaliação das propriedades mecânicas, térmicas e de barreira**. Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade

Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo. p. 179, 2003.

SEYEDI, S., KOOCHKEI, A., MOHEBBI, M., ZAHEDI, Y. *Lepidium perfoliatum* seed gum: A new source of carbohydrate to make a biodegradable film. **Carbo. Poly.** v. 101, p. 349-358, 2014.

SHAHABI-GHAHFARROKHI, I., KHODAIYAN, F., MOUSAVI, M., YOUSEFI, H. Preparation of UV-protective kefir/nano-ZnO nanocomposites: Physical and mechanical properties. **Biol. Macro.** v. 72, p. 41-46, 2015.

SHEN, Y., WU, P. Two-dimensional ATR-FTIR spectroscopic investigation on water diffusion in polypropylene film: water bending vibration. **Phys. Chem.** v. 107, p. 4224-4226, 2003.

SILVA, J.D. **Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Análise de Alimento. Viçosa – MG. Universidade Federal de Viçosa, MG. UFV. v. 3, p. 235, 1998.

SYNYTSYA, A., ČOPÍKOVÁ, J., MATĚJKA, P., MACHOVIČ, V. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. **Carbo. Poly.** v. 54, p. 97-106, 2003.

TONDREAU, T., LAGNEAUX, L., DEJENEFTE, M., DELFORGE, A., MASSY, M., MORTIER, C., BRON, D. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. **Cytother.** v. 6, p. 372, 2004.

VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Sci.** v. 260, p. 920–926, 1993.

VASCO, M. C. **Efeito da radiação gama sobre as propriedades mecânicas de compósito de fibras de sisal/poliuretana sem uso de agentes de acoplamento**. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Engenharia Mecânica e de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba. p. 64, 2014.

VU, B., CHEN, M., CRAWFORD, R. J., IVANOVA, E. P. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. **Molec.** v.14. p. 2535-2554, 2009.

VRIESMANN, L. C., PETKOWSKI, C. L. O., CARNEIRO, P. I. B., CARNEIRO, E. B. B. Polissacarídeos de frutos do cambuí (*Myrciaria tenella*, Berg). Publ. UEPG Ci. **Ex. Ter.** v. 10, p. 41-45, 2004.

WANG, Y., AHMED, Z., FENG, W., LI, C., SONG, S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. **Biol. Macro.** v. 43, p. 283-288, 2008.

WESCHENFELDER, S., PEREIRA, G. D. M., CARVALHO, H. H. C., WIEST, J. M. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Med.Vet. Zoo.** v. 63, p. 473-480, 2011.

WOLKERS, W. F., OLIVER, A. E., TABLIN, F., CROWE, J. H. A Fourier transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. **Carbo. Res.** v. 339, p. 1077-1085, 2004.

WU, P., SIESLER, H. W. Water diffusion into epoxy resin: a 2D correlation ATR-FTIR investigation. **Chem. Phys.** v. 374, p. 74-78, 2003.

XU, X., LIU, W., ZHANG, L. Rheological behavior of Aeromonas gum in aqueous solutions. **Food Hydro.** v. 20, p. 723-729, 2006.

YOSHIDA, M. I. Thermal analysis of environmentally compatible polymers containing plant components in the main chain. **Therm. Anal. Calor.** v. 67, p. 305-312, 2002.

YUAN, Y., LEE, T. R. **Contact angle and wetting properties.** In: Surf. Sci. Tech. Springer Berlin Heidelberg. p. 3-34, 2013.

ZHANG, Y., HAN, J. H. Plasticization of Pea starch films with monosaccharides and polyols. **Food Sci.** v.71, p. 253-261, 2006.

ZIANI, K., OSES, J., COMA, V., MATÉ, J. I. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **Food Sci. Tech.** v. 41, p. 2159-2165, 2008.

ZOLFI, M., KHODAIYAN, F., MOUSAVI, M., HASHEMI, M. The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran–whey protein by nanoparticle incorporation. **Carbo. Poly.** v. 109, p. 118-125, 2014a.

ZOLFI, M., KHODAIYAN, F., MOUSAVI, M., HASHEMI, M. Development and characterization of the kefiran-whey protein isolate-TiO nanocomposite films. **Biol. Macro.** v. 65, p. 340-345, 2014b.

ZRINYI, M. Intelligent polymer gels controlled by magnetic fields. **Col. Poly. Sci.** v. 278, p. 98-103, 2000.

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME DE KEFIRANA COM POTENCIAL APLICAÇÃO COMO SUBSTITUTO TEMPORÁRIO DE PELE

C.A.S. Silva*, N.A. Onofre*, G.M. Santana*, L.C. Miranda**, Y.E.O. Silva*, D.R. PEREIRA**
C.S.A. Lima** e R. Yara*

* Departamento de Engenharia Biomédica – Centro de Tecnologia e Geociências – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

** Departamento de Biofísica e Radiobiologia – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
e-mail: ricardo.yara@gmail.com

Resumo: A pele é o maior órgão do corpo humano e possui grande importância na proteção do organismo. Os substitutos temporários de pele, confeccionados com biomateriais, são utilizados para prevenir infecções e auxiliar na regeneração do tecido. Os polímeros são uma classe importante de biomateriais, que podem ser utilizados para a confecção de substitutos temporários de pele. A kefirana é um polímero natural, obtida de um consórcio microbiano denominado de kefir. Esta pode ser formulada como filmes, com potencial uso como substitutos temporários de pele. A este polímero são atribuídas diversas atividades biológicas, inclusive uma ação anti-inflamatória. O objetivo deste trabalho foi de produzir kefirana e desenvolver filmes poliméricos visando produzir substitutos temporários de pele. Para tanto foram elaboradas duas formulações de filmes com a utilização de solventes neutro (Filme 1) e alcalino (Filme 2) que foram analisados quanto a espessura, transparência, teor de umidade e avaliação da sua composição através da espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Foram obtidos filmes homogêneos, sem rachaduras e flexíveis. O filme 1 apresentou maior espessura e maior teor de umidade, e o filme 2 apresentou melhor reprodutibilidade. Entretanto não foram observadas diferenças significativas na composição dos filmes quando comparados na análise por FTIR.

Palavras-chave: filmes poliméricos, kefirana, biomaterial, substitutos temporários de pele.

Abstract: *The skin is the largest organ of the human body and plays an important role protecting the body. Temporary skin substitutes made with biomaterials are used in tissue regeneration and also to prevent infections. The polymers are an important class of biomaterials that can be used as temporary skin substitutes. Kefiran is a natural polymer obtained from a microbial consortium called kefir. The polymer can be formulated as films with potential use as temporary skin substitutes. For this polymer are attributed some biological activities, as anti-inflammatory action, prime factor for biocompatibility. The objective of this work was to develop polymer films of kefirana, produce temporary skin substitutes. It was performed two formulations for the films using neutral solvents (Film 1) and alkaline solution (Film 2), both of*

them were evaluated for thickness, transparency and moisture content. The evaluations of its composition were performed by spectrometry in the infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR). The films had an appearance of homogeneous, flexible and without cracks. The film 1 was significantly thicker and higher moisture content, and the film 2 showed better reproducibility. However, no significant differences were observed in the composition of the films when compared in the analysis by FTIR.

Keywords: *films, kefirana, biomaterials, temporary skin substitute.*

Introdução

A pele recobre toda a superfície do corpo humano, sendo considerado seu maior órgão [1]. É a primeira linha de defesa do organismo. Devido a sua extrema importância, havendo lesão na pele, é necessária rápida intervenção, a fim de se garantir a possibilidade de regeneração [2]. Os substitutos temporários de pele são utilizados para prevenir infecções e auxiliar nesta regeneração [3]. São confeccionados com biomateriais, sendo que a classe dos polímeros tem destaque na elaboração destes substitutos temporários [4]. Os polímeros representam uma classe importante de biomateriais, sendo amplamente utilizados nas áreas ortopédicas, odontológicas, cardiovascular e de engenharia de tecidos [5]. A kefirana é um polímero natural. Este polímero é composto por dois monossacarídeos: glicose e galactose, em proporções praticamente iguais [7]. Como demonstrado por Moreira [8], o biopolímero produzido a partir do Kefir, possui uma atividade anti-inflamatória. Este trabalho apresenta o desenvolvimento de uma nova técnica de produção de filmes de kefirana, podendo ser aplicados como substitutos de tecidos danificados e/ou como estimuladores de regeneração, auxiliando nos processos de inflamação.

Materiais e métodos

Produção do kefir – A cultura do kefir foi coletada de consumidores habituais deste produto. Baseado em informações coletadas em catálogos, revistas de

divulgação popular e na rede mundial de computadores, foi montado um método de cultivo onde os grãos de kefir foram pesados e a sua massa (g) serviu de referência para calcular o volume de solução de açúcar mascavo a 50% (m/v), utilizado como substrato. A solução foi filtrada para remover impurezas do açúcar. Os grãos foram mantidos em temperatura ambiente, e procederam-se repicagens a cada 48 horas. Visando a diminuição de impurezas oriundas do açúcar mascavo, foi elaborado um processo de clareamento, onde os grãos foram mantidos em solução de açúcar cristal a 50% (m/v), sendo realizadas três repicagens.

Métodos de extração da kefirana – Inicialmente, a extração da kefirana foi realizada a partir do protocolo descrito por Moreira [8], (método de extração de kefirana 1). Outro método foi desenvolvido, onde os grãos de kefir foram colocados em Becker contendo uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol.L⁻¹, sendo mantida sob agitação e fervura durante 1 hora. Após esse período, a mistura foi resfriada e neutralizada com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1mol.L⁻¹, seguindo-se com filtração. Após a filtração, foi adicionado etanol (92,8° inpm) gelado. O produto foi mantido sob refrigeração, a 4°C por 15 horas (overnight), sucedendo-se a centrifugação. Após centrifugação o precipitado foi recolhido e lavado duas vezes com etanol. Finalmente o polímero foi dissolvido em água quente (método de extração de kefirana 2).

O rendimento das extrações (R) foram calculados pela diferença do peso inicial (P_i) e final (P_f) de cada processo, a partir da equação 1.

$$R(\%) = \frac{P_f}{P_i} \times 100 \quad (1)$$

O polímero foi ainda submetido pelo processo de congelamento e descongelamento, que consiste de solubilização do mesmo em água deionizada quente e posterior congelamento a -25°C e descongelamento a temperatura ambiente, sendo repetidas três vezes. Por fim, o precipitado foi novamente recolhido por centrifugação.

Estimativa do total de carboidratos – Foi realizado através do método do fenol ácido sulfúrico [9, 10], onde em meio ácido e quente a glicose é desidratada, formando um produto verde, com máximo de absorção em 490 nm. Após a leitura da absorbância, foi realizado o cálculo da quantidade de carboidratos presentes na solução da amostra através da equação 2.

$$C(\%) = \frac{x}{0,1} \times 100 \text{ mg de glicose} \quad (2)$$

Difração de Raios-X (DRX) – Utilizou-se para esta análise um equipamento de DRX (Shimadzu XRD 7000), com alvo de Cobre e $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$.

Desenvolvimento dos filmes – Os filmes foram obtidos pelo sistema de “casting” que é a secagem de uma solução do polímero. Foram produzidos filmes a partir de dois métodos diferentes. No primeiro método, o polímero úmido foi dissolvido em água deionizada, sendo aquecida em micro-ondas obtendo-se uma suspensão. A seguir foi adicionado glicerol como agente plastificante. A solução foi vertida em uma placa de Petri e levada à estufa de secagem com por 16 horas a 40°C, para evaporação do

solvente, formando o filme 1. No segundo método o polímero em pó foi dissolvido em NH₄OH, em banho-maria com temperatura entre 85° C $\pm$ 5°. A seguir foi adicionado glicerol. A solução foi vertida em uma placa de Petri e a secagem foi em capela a temperatura ambiente por 24 horas.

Caracterização dos filmes – Foram avaliadas as propriedades microestruturais, físicas, mecânicas e espectroscópicas dos filmes.

Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) – Realizou-se o FTIR, utilizando um espectrofotômetro (BRUKER IFS66), utilizando um intervalo de números de onda de 4000-650 cm⁻¹, para identificar os grupos funcionais presentes nas amostras.

Espessura – A espessura dos filmes foi obtida com auxílio de um micrômetro (Great Wall, 428840), de precisão 0,01 mm. Foram realizadas medidas de cada tratamento, em triplicata, tomando-se medida de 5 pontos diferentes de cada amostra, totalizando 15 medidas de cada tratamento. O resultado foi obtido a partir da média das medidas de cada tratamento.

Transparência – Para a determinação da transparência (T) foram medidas as absorbâncias dos filmes a 600 nm (A₆₀₀) e a espessura dos mesmos em mm (x). A transparência foi então calculada através da equação 3. Um valor de T baixo representa menor transparência do filme [11].

$$T = \frac{-\log A_{600}}{x} \quad (3)$$

Teor de umidade – O teor de umidade dos filmes foi avaliado através da medida de perda de peso, segundo [12]. Para isso, amostras de cada filme, em triplicata, foram pesadas em balança analítica e em seguida aquecidas em estufa de secagem a 105 $\pm$ 1°C, até peso constante. As amostras foram então resfriadas em dessecador até temperatura ambiente até peso constante. A umidade contida nas amostras foi relacionada à perda de peso, de acordo com a equação 4.

$$U\% = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (4)$$

Análises estatísticas – Aplicado o teste t de Student, (ANOVA) seguido de teste de Tukey com nível de significância de 5% (p<0,05). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico Prism5

Resultados

Produção do kefir – Após avaliações sobre o crescimento dos grãos de kefir, observou-se um bom crescimento da cultura, utilizando-se padronização na quantidade de substrato em relação ao peso de grãos e maior intervalo de tempo entre as repicagens. Em relação ao processo de clareamento, este se mostrou eficaz pela diminuição da cor marrom típica do açúcar mascavo.

Extração da kefirana – Após observar o baixo rendimento no método de extração 1 criou-se a necessidade de uma adaptação do método, originando assim o método de extração 2. O método de extração 2 apresentou rendimento de 9,95% (99,5 g/Kg de grãos de

kefir), em contraste o rendimento obtido pelo método de extração 1, foi de 1,15% (11,5 g/Kg de grãos de kefir), sendo esta diferença significativa ($p < 0,05$).

Após a técnica de congelamento e descongelamento, a kefirana se mostrou com coloração mais clara, indicando a remoção de resquícios do açúcar mascavo utilizado como substrato.

Estimativa do total de carboidratos – Foram realizados testes para estimar o total de carboidratos nos dois métodos de extração (Tabela 1).

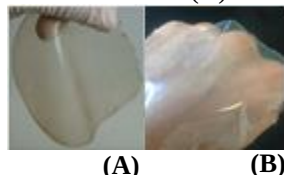
Tabela 1: Valores de carboidratos totais da kefirana.

Método de extração	[mg/mL]	(%)
1	$1,96 \pm 0,003$	97,94
2	$1,69 \pm 0,006$	84,64

DRX – As amostras foram caracterizadas por difração de raio X. Nesta análise, o difratograma indicou ausência de picos definidos, com o aparecimento apenas de um pico largo, característico de estruturas sem ordenamento de longo alcance, sendo considerado amorfo.

Desenvolvimento dos filmes – Os filmes de kefirana apresentaram-se macroscopicamente homogêneos, sem rachaduras e flexíveis, sendo removidos das placas facilmente. Comparando os filmes produzidos pelas duas técnicas, o filme 1 apresentou uma difícil reprodutibilidade, e um aspecto mais opaco, enquanto que o filme 2 mostrou-se de fácil reprodutibilidade (figura 1).

Figura 1: Filmes de kefirana (A) filme 1 (B) filme 2.



FTIR – Os espectros na região do infravermelho dos filmes 1 e 2, apresentaram picos que confirmaram os dados previstos para polímeros à base de kefirana. Observou-se os máximos em 3250 e 3272 cm^{-1} nos espectros dos filmes 1 e 2 respectivamente, que são atribuídas à deformação axial de grupamento hidroxila (O-H) dos polímeros. As bandas localizadas em 2923 e 2852 cm^{-1} no filme 1 e 2928 no filme 2 referem-se à deformação axial simétrica e assimétrica de C-H em grupos funcionais metileno (CH_2). Os máximos apresentados em 1740 e 1646 cm^{-1} nos filmes 1 e 2 respectivamente, são atribuídas à deformação angular de O-H das moléculas de água presentes nos polímeros. As bandas localizadas em 1490 e 1330 cm^{-1} nos filmes 1 e 2 referem-se a deformação angular de C-H de grupos metilenos (CH_2). Observou-se também dois máximos de absorção a 1015 cm^{-1} para o filme 1 e 1041 cm^{-1} para o filme 2 atribuídas à deformação angular de C-O-C dos anéis dos carboidratos presentes na estrutura dos polímeros, e aos grupamentos laterais C-OH e C-H (figura 2).

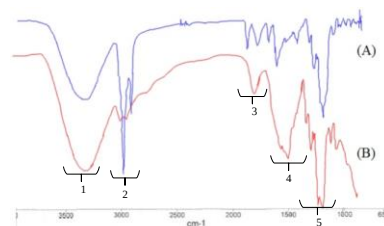


Figura 2: Gráfico referente ao espectro de FTIR dos filmes (A) filme 1 (B) filme 2. Região 1: referente a $3450\text{--}3260 \text{ cm}^{-1}$; região 2: referente a $3000\text{--}2800 \text{ cm}^{-1}$; região 3: referente a $1740\text{--}1600 \text{ cm}^{-1}$; região 4: referente a $1500\text{--}1250 \text{ cm}^{-1}$; região 5: referente a $1250\text{--}1000 \text{ cm}^{-1}$.

Espessura, transparência e teor de umidade – Os resultados das análises de espessura, transparência e teor de umidade dos filmes estão expressos na tabela 2.

Tabela 2: Espessura, transparência e teor de umidade dos filmes.

FILME	ESPESSURA (μm)	TRANSPARÊNCIA	TEOR DE UMIDADE (%)
1	96 ± 8^a	$3,62^a$	$16,91 \pm 0,520^b$
2	37 ± 4^b	$2,32^a$	$24,62 \pm 0,223^a$

Diferentes letras em uma mesma coluna correspondem a valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A espessura apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo o filme 2 menos espesso. Não houve diferença significativa entre a transparência dos dois filmes ($p > 0,05$). O filme 1 apresentou teor de umidade menor em relação ao filme 2, sendo essa estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Discussão

O rendimento encontrado no método de extração 1 foi cerca de 10 vezes superior ao encontrado por Moreira [8]. Zara, Thomazini e Lanz [13] mostraram que soluções de NaOH são mais eficientes na extração de polímeros naturais do que a água, devido a ação da força iônica. Apesar do método de extração 1 resultar em amostra com maior teor de carboidrato (97,94%), o método 2 apresentou rendimento consideravelmente maior que o método 1.

Os filmes produzidos a partir de ambas as amostras de kefirana foram flexíveis e facilmente removidos das placas, comportamento semelhante aos filmes de kefirana produzidos por Piermaria [17].

Em relação à análise de FTIR, os filmes apresentaram uma banda intensa e alargada na região de 3000 cm^{-1} e outra banda forte em torno de 1000 cm^{-1} . Segundo Wang; Bi [18] polissacarídeos contêm um número significativo de grupos hidroxila, exibindo uma banda alargada na região de 3000 cm^{-1} . Além disso, a presença de hidratos de carbono está associada aos máximos na região entre 1250 e 1000 cm^{-1} , tratando-se da região de impressão digital (região abaixo de 1500 cm^{-1}), confirmando que trata de polissacarídeos.

A espessura dos filmes produzidos variou entre 37 e 96 μm . Ghasemlou [19] produziu filmes comestíveis de kefirana com espessura variando entre 58 e 67 μm . Já os filmes de kefirana produzidos por Piermaria [11] foram ainda mais finos (18 – 21 μm). Segundo Pires; Moraes [20], substitutos de pele são geralmente mais finos do que a derme humana, cuja espessura varia de 500 a 2000 μm . Sendo assim, considerando este aspecto, os filmes preparados têm potencial para serem utilizados como curativos cutâneos. A transparência do filme de kefirana 1 (3,68), foi um pouco superior a encontrada no filme de kefirana produzido por Piermaria [11] onde esse valor foi de 2,71, resultado semelhante ao do filme 2 (2,32). Os filmes apresentaram teor de umidade dentro do esperado na literatura. Piermaria [11], desenvolvendo filmes de kefirana, encontrou valores de umidade variando de 14,76% a 36,39%. Ghasemlou [19], também trabalhando com filmes de kefirana encontrou o teor de umidade variando entre 17,95% e 37,04%.

Conclusão

A partir da produção em batelada, utilizando-se açúcar cristal nas três últimas repicagens, obtiveram-se grãos de kefir de coloração branca, a partir dos quais foi extraída a kefirana. Desenvolveu-se adicionalmente, uma nova forma de extração da kefirana, utilizando-se uma solução 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH.

Após a obtenção do polímero, produziu-se filmes de kefirana usando o sistema de “casting”. Através do difratograma de raio X, foi possível constatar que as amostras apresentavam uma estrutura amorfa. Todos os filmes produzidos se mostraram macroscopicamente homogêneos, sem rachaduras e flexíveis, porém a técnica do filme 1 obteve pouca reprodutibilidade. O filme 2 apresentou menor espessura, maior teor de umidade, além de uma excelente reprodutibilidade, sendo assim o melhor filme das duas técnicas.

Agradecimentos

Agradecemos aos Departamentos de Física e de Química da UFPE pelas análises DRX e FTIR. Agradecemos a FACEPE, a CAPES e a PROPESQ / UFPE pelo apoio financeiro através do Edital Apoio a Grupos de Pesquisa pela PROPESQ 23076021831201289

Referências

- [1] BLANES, L. Tratamento de feridas. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: Baptista-Silva JCC editor, 2004.
- [2] RODRIGUES, B. F. F. S. **Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras**. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.
- [3] OSMAN, S. A., SOUZA, F. C.; DOLCI, J. E. Estudo experimental sobre a aplicação de película de celulose (bionext®) em área cruenta de ressecção de concha nasal de coelhos. **ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia**, v. 25, p.304-311, 2007.
- [4] ADRIÃO, R. J. B. **Biomateriais e reações de hipersensibilidade - um problema ortopédico?** 43 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2011.
- [5] RATNER, B. D. et al. **An introduction to materials in medicine**. Academic Press, San Diego, 2004.
- [7] LA RIVIÈRE, J. W. M.; KOOIMAN, F. Kefiran, a Novel Polysaccharide Produced in the Kefir Grain by *Lactobacillus brevis*. **Archiv für Mikrobiologie**, v.59, p.269-278, 1967.
- [8] MOREIRA, M. E. C. et al. Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, v.31, p. 1738-1742, 2008.
- [9] DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem.**, v.26, p.350, 1956.
- [10] KRISHNAVENI, S. et al. Determination of Total Carbohydrate. **Food Chem.**, v.15, p.229, 1984.
- [11] PIERMARIA, J. A. et al. Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. **Food Hydrocolloids**, v.23, p. 684–690, 2009.
- [12] FERREIRA, C. S. **Desenvolvimento do processo de obtenção de filme polimérico a partir da cinza da casca de arroz**. 75p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.
- [13] ZARA, R. F.; M. H. THOMAZINI; G. F. LANZ. Estudo da eficiência de polímero natural extraído do cacto mandacaru (*Cereus jamacaru*) como auxiliar nos processos de coagulação e floculação no tratamento de água. **Revista de estudos ambientais** v.14, n.2, p.75-83, 2012.
- [17] PIERMARIA, J. A. et al. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FTIR spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1261-1269, 2011.
- [18] WANG, M.; BI, J. Modification of characteristics of kefir by changing the carbon source of *Lactobacillus kefirifaciens*. **J Sci Food Agric**. v.88, p.763–769, 2008.
- [19] GHASEMLOU, M. et al. Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. **Food Chemistry**, v.127, p.1496–1502. 2011.
- [20] PIRES, A. L. R., MORAES, A. M. Avaliação do efeito do pH e da temperatura de secagem nas características de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata. **7º Congresso Latino Americano de Biomateriais e Órgãos Artificiais**. Natal, 2012.