

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

REGINA SILVA PICASSO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE CITOTÓXICA E
IMUNOMODULATÓRIA DE UM NOVO EXOPOLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DOS
GRÃOS DE KEFIR.**

Recife

2017

REGINA SILVA PICASSO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE CITOTÓXICA E
IMUNOMODULATÓRIA DE UM NOVO EXOPOLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DOS
GRÃOS DE KEFIR.**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Cláudia Sampaio
de Andrade Lima

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso, CRB-4/ 1728

Picasso, Regina Silva

Caracterização estrutural e atividade citotóxica e imunomodulatória de um novo exopolissacarídeo extraído dos grãos de Kefir. / Regina Silva Picasso. – 2017.

92 f. : il., fig., tab.

Orientador: Ricardo Yara

Coorientadora: Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Morfotecnologia, Recife, 2017.

Inclui referências e anexo

1. Polissacarídeos 2. Kefir 3. Testes de toxicidade I. Yara, Ricardo (orient.) II. Lima, Cláudia Sampaio de Andrade (coorient.) III. Título

547.782

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-002

REGINA SILVA PICASSO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE CITOTÓXICA E
IMUNOMODULATÓRIA DE UM NOVO EXOPOLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DOS
GRÃOS DE KEFIR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em 31/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Yara, UFPE (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Kênia Valença Correia (Examinadora [Interna])
Instituto Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dra. Silene Carneiro do Nascimento (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que Ele fez, faz e irá fazer em minha vida, por ter me guiado e ensinado o caminho reto, pois nunca me abandonou. Sou grata por mais uma etapa em minha vida com o término deste trabalho.

Ao Professor Dr^o. Ricardo Yara por ter me orientado e me acolhido em seu laboratório, pessoa com quem aprendi muito e por ter acreditado em mim, quando pensei na época que não era capaz. Agradeço a professora Claudia Sampaio por ela ter sempre me incentivado, pois no começo me julgava incapaz da realização de qualquer trabalho, pela orientação e pelo incentivo no aperfeiçoamento do saber e por toda a amizade formada durante esse tempo.

Ao meu esposo Rafael Jorge Santos Aracati Padilha que esteve comigo me ajudando, me incentivando, e colaborando comigo desde o começo desse trabalho em tantas atividades que certamente não seria capaz de conseguir sem ele.

Aos meus pais, Marleide Virgínia Silva Picasso e Nicolás Picasso Gallego pelo amor, carinho e providência.

Às minhas irmãs Virgínia e Sofia e aos meus cunhados André e Noel por terem me acompanhado durante todo este tempo, pela companhia e viagens que me ajudaram a diminuir minha ansiedade nessa época tão peculiar da minha vida.

Ao meu sobrinho Lucas um presente de Deus na minha vida, pelo sorriso lindo que toda vez me dá quando o vejo, pela alegria que sempre me passou me ajudando a esquecer dos problemas e pelas tardes maravilhosas juntos.

Aos meus tios e primos, tia Ceça, tia Ângela, tio Fernando e a minha tia Janne que, infelizmente, não está mais entre nós desde maio de 2017, mas que me incentivou e estava sempre interessada no desenvolvimento deste trabalho, a minha prima Cecinha e seu companheiro Carlos, aos meus primos Thiago, Thomás, Uel, Juninho e suas companheiras Antônia, Kammila, Marga e Claudiana, a nossa agregada considerada prima Ana Cláudia e ao meu primo sobrinho Ruan.

Aos meus sogros Paulo Aracati e Teresa Cristina que sempre me ajudaram com o sustento, apoio e me acompanharam por todo esse período de mestrado suprindo as necessidades.

Ao meu amigo Paulo Antônio Galindo Soares por ser um amigo que pude contar desde a época da graduação, por toda a orientação em muitos pontos desse trabalho.

Ao professor Paulo Antônio de Souza Mourão por ter contribuído pelas análises feitas no Rio de Janeiro que ajudaram na elucidação da estrutura do biopolímero.

A professora Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo do Departamento de Imunologia Aggeu Magalhães e a professora Dr^a Virgínia Maria Barros de Lorena pelo apoio nas análises citotóxicas, realizadas no Departamento de Imunologia no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães.

A professora Dra. Silene Carneiro do Nascimento e a técnica Maria do Desterro Rodrigues pelas análises de citotoxicidade com as linhagens tumorais realizadas no Departamento de Antibióticos.

A todos do Laboratório de Biofísica Química, porque toda a pesquisa fica mais fácil quando temos amigos que sempre estão dispostos a ajudar, especialmente ao grupo do kefir: Diogo, que me ensinou a cultivar o kefir e me ajudou muito nos experimentos e em muitas outras coisas, Natália, me fez entender muito sobre o kefir, Flávia, Vinícius, Ricardo, Duda, Luzia, Aline e Antônio pela companhia, pelas conversas e incentivos, por estar ao meu lado durante todo esse projeto me auxiliando nas “trocas do kefir”, a Thiago Vêras que me ajudou muito com seus conhecimentos e me auxiliou quando estive perdida, a Paola que me suportou desabafando e por ser essa amiga maravilhosa que sempre esteve ao meu lado e aos demais do laboratório João Paulo, que me ajudou muito nos experimentos, Brunna, Marília Lima, Marília, Grazi, Leyla, Renan, Niedja, Yago, Ana Lu, Alice, Bruna Corina, Juan, Amanda, Paulo Euzébio, Ossamu, Bela, Aline Pitt e todos os outros que fazem ou fizeram parte da rotina deste laboratório.

A todos da igreja Maranata que estiveram vivenciando os meus estudos e continuamente oravam por isso: pastor Nivaldo, pastor Stênio, Isabelle, Carlos Melo, Alexandre, Walquíria, Valéria, Cris, Richard, Adriano, Thiago, Jully, Jéssyca, Washington, Gisele, Hércules,

Antônio, Larissa, Gabriel, Rai, Zeza, Vandete, Júlia, Alvetete, Veronessa, Andréia, Rebeca, Dôra, Prazeres, Suely, Mônica, Lia, Ivanildo, Vivi, Duda, a tantos outros irmãos e aos meus queridos alunos adolescentes Yanni, Victor, Davi e Ryan

A minha amiga Julianne, que, embora distante, nunca se esquece de mim e tem me ajudado desde o período escolar, me animando, me dando soluções para os problemas que surgiam e me acompanhando sempre em tudo.

A minha turma de Biomedicina 2009.2, em destaque Aluizio que me presenteou com o livro de Imunologia Celular e Molecular em 2007, muito utilizado neste trabalho, Rafael Lira, Vanessa Kiffer, Vanessa Régia e todos os demais que sempre estão me apoiando e torcendo por mim.

A professora Kênia, a professora Silene e ao professor Jacinto por terem me ajudado na qualificação com preciosos conselhos e correções e às professoras por terem aceito participar da minha banca de defesa do mestrado.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, pelos momentos inesquecíveis das aulas com os professores, amigos e funcionários durante todo esse projeto.

À SUDENE pelo apoio financeiro durante o período de desenvolvimento desta dissertação;

Muito obrigada.

*“Esperei com paciência no SENHOR,
e ele se inclinou para mim, e ouviu o meu clamor.”*

(BÍBLIA , Salmos, 40, 1)

RESUMO

Os polissacarídeos possuem diversas aplicações em diferentes áreas, como alimentícias, têxteis, indústrias de papel, cosméticas e farmacêuticas. Os polissacarídeos de origem microbiana (exopolissacarídeos) têm sido principal fonte de estudos, pois são renováveis, com pouca toxicidade, sendo alvo desses ramos industriais. O consórcio microbiano de kefir produz exopolissacarídeos que são tradicionalmente extraídos em soluções aquosas neutras com o auxílio de calor e estes já demonstraram em estudos anteriores que possuem atividades antimicrobiana, antioxidante e até mesmo antitumoral. Reconhecendo os benefícios do kefir, este estudo visa à extração em meio alcalino e análise estrutural de exopolissacarídeos a partir de grãos de kefir, seguido de precipitação etanólica e avaliação da atividade antitumoral e citotóxica. A partir de análises como o FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier), TG (Termogravimetria), DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial), ensaios de acetilação, metilação e RMN (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear) foi possível determinar a estrutura do biomaterial. O mesmo trata-se de um homopolissacarídeo seguido de monômeros de glicose, típicos de glucana com predominância de ligações β (1-6). Foram realizados ensaios de citotoxicidade com células tumorais e células normais (linfócitos), onde foi observado potencial citotóxico alto (70%) para leucemia mielocítica crônica (K-562) e moderado (58%) para adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), assim como foi realizado um ensaio com células normais (linfócitos) a partir de um kit contendo citocinas: IL-2 (Interleucina 2), IL-4 (Interleucina 4), IL-6 (Interleucina 6), IL-10 (Interleucina 10), TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α) e IFN- γ (Interferon -gama) demonstrando que o exopolissacarídeo é um pró-cicatrizante por promover ação em TNF- α e IL-6. Diante do potencial farmacológico desse material, o mesmo pode ser aplicado para a produção de biofilmes como cicatrizantes, ou ainda em outros ramos industriais.

Palavras-chave: Exopolissacarídeo. Atividade antitumoral. Resposta pró-inflamatória.

ABSTRACT

Polysaccharides have several applications in different areas such as food, textiles, paper, cosmetics and pharmaceutical industries. Polysaccharides of microbial origin (exopolysaccharides) have been the main source of several studies, since they are renewable and present low toxicity. The microbial biofilm from kefir produces exopolysaccharides traditionally extracted in neutral aqueous medium under heat and have already shown in previous studies antimicrobial, antioxidant and even antitumor activities. Recognizing the benefits of kefir, this study aims to extract exopolysaccharides from kefir grains using a different approach using alkaline medium extraction, and its structural characterization and evaluation of its antitumor and cytotoxic activity. The results of FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy), TG (Thermogravimetric), DSC (Differential scanning calorimetry), acetylation, methylation and NMR (Nuclear magnetic resonance) analyses allowed us to reach the structure of the polymer. It is a branched homopolysaccharide containing mainly β -D glucose residues with (β 1 \rightarrow 6) linkages. The cytotoxicity assays using tumor cells demonstrated a high cytotoxic potential (70%) for chronic myelocytic leukemia (K-562) and moderate (58%) for human breast adenocarcinoma (MCF-7), in addition as a normal cell (lymphocyte) assay was performed from a kit containing cytokines: IL-2 (Interleukin 2), IL-4 (Interleukin 4), IL-6 (Interleukin 6), IL-10), TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) and IFN- γ (Interferon-gamma) demonstrating that the exopolysaccharide is a pro-inflammatory agent stimulating the production of TNF- α and IL-6. Faced with the pharmacological potential of this exopolysaccharide as an antitumoral agent, it can also be applied as raw material for the synthesis of biomaterials to stimulate the healing process of cutaneous wounds.

Key words: Exopolysaccharide. Antitumoral activity. Proinflammatory response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|--------------------|--|----|
| FIGURA 1 - | Representação de aldose (D-glicose) e cetose (D-frutose)..... | 18 |
| FIGURA 2 - | Exemplos de monossacarídeos (aldoses) de 3 a 6 carbonos. Triose (D-Gliceraldeído); Tetrose (D-Eritrose); Pentose (D-Xilose) e Hexose (D-Glicose)..... | 19 |
| FIGURA 3 - | Formação das duas formas cíclicas da glicose: α -D-glicopiranosose e β -D-glicopiranosose..... | 20 |
| FIGURA 4 - | Homo e Heteropolissacarídeos: (A) polissacarídeo não ramificado e (B) polissacarídeo ramificado..... | 21 |
| FIGURA 5 - | Estrutura da kefirana esquematizada a partir do trabalho encontrado em Vu & cols., 2009..... | 27 |
| FIGURA 6 - | Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma..... | 29 |
| FIGURA 7 - | Esfregaço de um paciente com leucemia mieloide crônica..... | 30 |
| FIGURA 8 - | Lâmina histológica de um paciente com Adenocarcinoma de mama..... | 31 |
| FIGURA 9 - | Lâmina histológica de Carcinoma de Laringe..... | 32 |
| FIGURA 10 - | Diagrama de um cromatógrafo a gás..... | 39 |
| FIGURA 11 - | (A) Antes do clareamento; (B) Depois do clareamento | 42 |
| FIGURA 12 - | Processo de extração e purificação do exopolissacarídeo (Fonte pessoal)..... | 43 |
| FIGURA 13 - | Espectroscopia por infravermelho (FTIR) do exopolissacarídeo extraído dos grãos do kefir..... | 51 |
| FIGURA 14 - | Análise térmica: TG (A) e DSC (B) do exopolissacarídeo extraído dos grãos do kefir..... | 52 |
| FIGURA 15 - | Cromatogramas de gás de derivados de alditol de monossacarídeos padrão (1-ramnose, 2-arabnose, 3-manose, 4-glicose, 5-galactose) e exopolissacarídeo de kefir hidrolisado (EPS)..... | 53 |
| FIGURA 16 - | Estrutura proposta para o EPS obtido a partir de grãos de kefir..... | 55 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| FIGURA 17 - | Espectro de ^1H RMN ^1D a 900 MHz de EPS a partir dos grãos de kefir..... | 56 |
| FIGURA 18 - | 2D $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ editado HSQC a 900 MHz do EPS a partir da fermentação de grãos de kefir cultivados em açúcar mascavo..... | 57 |
| FIGURA 19 - | Efeitos da viabilidade celular de linfócitos humanos tratados com o exopolissacarídeo em diferentes concentrações..... | 59 |
| FIGURA 20 - | Perfil da produção de TNF- α e IL-6 promovida pelo exopolissacarídeo em culturas de linfócitos humanos em 24 horas de ensaio..... | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| TABELA - 1 | Micro-organismos encontrados no Kefir..... | 26 |
| TABELA - 2 | Lista de Polissacarídeos e Monossacarídeos encontrados no kefir..... | 28 |
| TABELA - 3 | Os tempos de retenção e as proporções dos derivados metilados obtidos a partir do EPS após hidrólise ácida durante 4 h..... | 54 |
| TABELA - 4 | Mudanças químicas de ^1H e ^{13}C das unidades fundadas no EPS obtidas a partir da fermentação de grãos de kefir açúcar mascavo... | 56 |

SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| CBA | Cytometric Bead Array |
| CGMS | Cromatografia Gasosa aliada a espectrometria de massas |
| DSC | Calorimetria Exploratória Diferencial |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| EPS | Exopolissacarídeo |
| FTIR | Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier |
| FTCβ | Fator transformador de crescimento β |
| HSQC | Heteronuclear Single-Quantum Correlation |
| IFN-γ | Interferon -gama |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| LLC | Leucemia Linfoide Crônica |
| mg | miligrama |
| mL | mililitro |
| μL | microlitro |
| μm | micrômetro |
| MTT | brometo de [3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliol] |
| ON | Óxido Nítrico |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NK | Células natural Killer |
| PBMC | Mononuclear cells from peripheral blood /Células Mononucleares de Sangue Periférico |
| RMN | Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear |
| SUS | Sistema único de Saúde |

| | |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| TG | Termogravimetria |
| Th | Células T helper |
| TNF-α | Fator de Necrose Tumoral- α |
| UV-VIS | Espectroscopia Ultravioleta-visível |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 2.1 CARBOIDRATOS..... | 18 |
| 2.1.1 Ação Biológica Dos Carboidratos Encontrados Na Natureza..... | 21 |
| 2.2 SÍNTESE, ESTRUTURAS E APLICAÇÕES DE EXOPOLISSACARÍDEOS | 22 |
| 2.2.1 Importância De Exopolissacarídeos Nas Indústrias | 25 |
| 2.3 KEFIR | 25 |
| 2.4 CÂNCER..... | 28 |
| 2.4.1 Leucemia Mieloide Crônica | 30 |
| 2.4.2 Adenocarcinoma De Mama..... | 31 |
| 2.4.3 Carcinoma De Laringe Humana..... | 32 |
| 2.5 MORTE CELULAR | 33 |
| 2.6 CULTURA DE CÉLULAS..... | 33 |
| 2.7 LINFÓCITOS | 35 |
| 2.8 CITOCINAS | 35 |
| 2.9 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UM EXOPOLISSACARÍDEO..... | 36 |
| 2.9.1 Espectroscopia Na Região Do Infravermelho | 36 |
| 2.9.2 DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) E TG (Termogravimetria) | 37 |
| 2.9.3 Cromatografia Gasosa | 38 |
| 2.9.4 Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear..... | 39 |
| 3 OBJETIVOS | 41 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 41 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 41 |
| 4 MATERIAIS & MÉTODOS | 42 |
| 4.1 CULTIVO DO KEFIR | 42 |
| 4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDO DO KEFIR | 42 |
| 4.3 TESTES DE CARACTERIZAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO | 44 |
| 4.3.1 Teste De Molisch | 44 |
| 4.3.2 Teste De Bradford (Doseamento De Proteínas Totais) | 44 |
| 4.3.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-VIS)..... | 45 |
| 4.3.4 Espectroscopia Infravermelho Por Transformada De Fourier (FTIR) | 45 |
| 4.3.5 Teste De Fenol Sulfúrico (Dubois) | 45 |

| | |
|---|----|
| 4.3.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) E Análise Termogravimétrica (TGA) | 45 |
| 4.3.7 Composição Monossacarídica | 46 |
| 4.3.8 Análise De Metilação | 46 |
| 4.3.9 Espectroscopia De Ressonancia Magnetica Nuclear (RMN) | 46 |
| 4.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA E ANTITUMORAL DO EPS EXTRAÍDO DOS GRAÇOS DE KEFIR | 47 |
| 4.5 ENSAIO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA A PARTIR DAS LINHAGENS DE CÉLULAS PRIMÁRIAS | 48 |
| 4.5.1 O Isolamento De Células Mononucleares Do Sangue Periférico (PBMCs) | 48 |
| 4.5.2 Cultura De Linfócitos E Estimulação <i>In Vitro</i> Com O Exopolissacarídeo | 48 |
| 4.5.3 Analise Da Viabilidade Celular | 48 |
| 4.5.4 Medição Da Produção De Citocinas Usando O Kit Cytometric Bead Array (CBA) | 49 |
| 4.5.5 Análise Estatística | 49 |
| 5 RESULTADOS & DISCUSSÃO | 50 |
| 5.1 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) | 51 |
| 5.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) | 52 |
| 5.3 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E ANÁLISE DA METILAÇÃO | 53 |
| 5.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONANCIA MAGNETICA NUCLEAR | 55 |
| 5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL | 58 |
| 5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE COM LINFÓCITOS (NECROSE E APOPTOSE) | 59 |
| 6 CONCLUSÃO | 62 |
| REFERÊNCIAS | 63 |
| ANEXO A - ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA SCIENTIA PLENA | 83 |
| ANEXO B - DEPÓSITO DE PATENTE | 91 |

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são macromoléculas compostas por várias unidades de monossacarídeos e, nos organismos vivos são sintetizados em diferentes estágios do ciclo de vida (MAHAPATRA; BARNEJEE, 2013). Os polissacarídeos possuem características favoráveis para uso em várias áreas industriais, dentre elas alimentícias, têxteis, cosméticas e farmacêuticas, pois muitos são renováveis, biodegradáveis e não tóxicos para as células normais e alguns apresentam características efetivas em células tumorais (WANG et al., 2015a; FREITAS et al., 2009). Estudos demonstram que determinados polissacarídeos possuem atividades biológicas relevantes: antibacterianas, antioxidantes, antitumorais e antiproliferativas, sendo suas diversidades estruturais responsáveis por muitas dessas ações (MOSADDEGH et al., 2014; ANISIMOVA et al., 2015). Micro-organismos podem produzir exopolissacarídeos (polissacarídeos extracelulares), um exemplo é o exopolissacarídeo contido no kefir (BOTELHO et al., 2014).

O kefir é um probiótico que possui um consórcio de bactérias e leveduras (LOPITZ-OTSOA, et al., 2006). As bactérias dos grãos de kefir podem ser ácido-lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*) e ácido-acéticas (espécies de *Acetobacter*) (BRASIL, 2007). Entre os fungos encontramos principalmente leveduras do gênero *Saccharomyces* e várias espécies de *Candida* (SIMOVA et al., 2002).

Diversas fontes de carboidratos podem ser utilizadas para o cultivo do kefir, dentre elas destacam-se o leite e o açúcar mascavo (MIGUEL et al., 2011), a partir desse cultivo, o kefir produz exopolissacarídeos (EPS). A kefirana é o EPS mais conhecido na literatura provindo da associação simbiótica do kefir (KOOIMAN, 1968).

O câncer é um importante problema de saúde pública mundial e é a segunda principal causa de morte nos Estados Unidos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016) e no Brasil segundo dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade do DATASUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Não obstante, o surgimento de linhagens tumorais resistentes aos medicamentos disponíveis tornam relevantes as pesquisas por novas estratégias e compostos antitumorais (SHI, 2016). Shiomi et al. (1982) publicaram o primeiro trabalho sobre atividade antitumoral *in vivo* de um polissacarídeo extraído dos grãos de kefir. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo a obtenção e caracterização de um exopolissacarídeo a partir dos grãos de kefir quando cultivados em solução de açúcar mascavo, análise estrutural e verificar a ação imunomodulatória, seu potencial imunológico e citotóxico frente a linhagens tumorais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

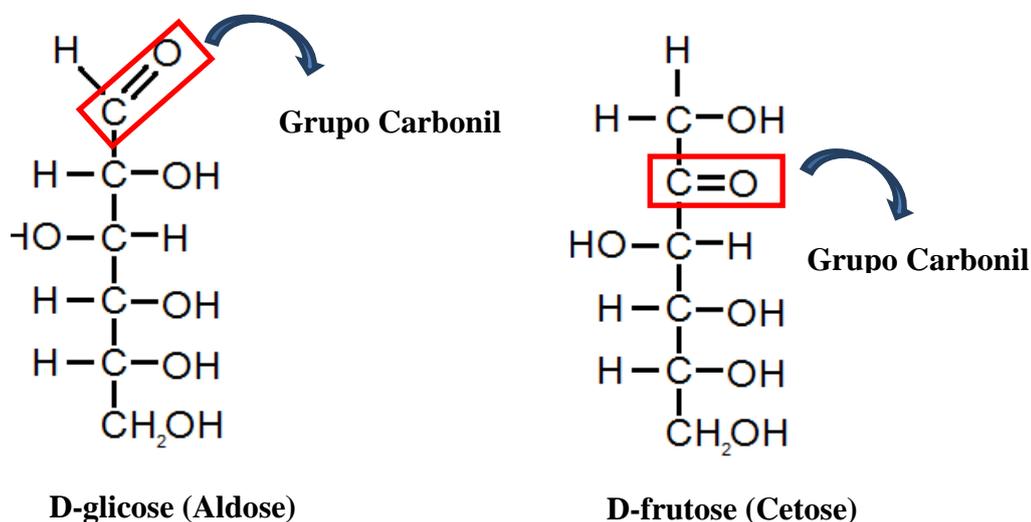
2.1 CARBOIDRATOS

Os carboidratos podem ser chamados de polidroxialdeídos ou poli-hidroxicetonas, que formam estes compostos quando hidrolisados, constituindo fórmula empírica de $(\text{CH}_2\text{O})_n$ constituídos principalmente de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (LEHNINGER, 1991).

Existem 3 classes principais de carboidratos: os monossacarídeos, os dissacarídeos e os polissacarídeos (NELSON; COX, 2011).

Os monossacarídeos ou açúcares simples são constituídos de uma única unidade de poliidroxialdeído ou poliidroxicetona. Quando o grupo carbonil está na extremidade da cadeia de carbonos (isto é, um grupo aldeído), o monossacarídeo é chamado de aldose, já quando o grupo carbonil está em qualquer outra posição (em um grupo cetona) este monossacarídeo é chamado de cetose (NELSON; COX, 2011) (**FIGURA 1**).

FIGURA 1 - Representação de aldose (D-glicose) e cetose (D-frutose).

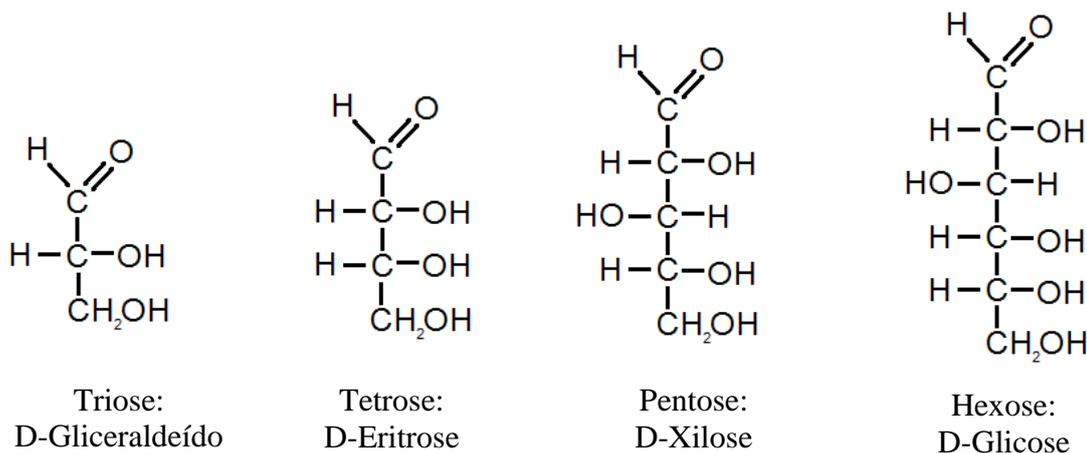


Fonte: Nelson e Cox (2011).

Entre os monossacarídeos encontram-se os de 3 a 7 carbonos que geralmente possuem gosto adocicado e são sempre solúveis em água, sendo bastante conhecidas as pentoses e hexoses. Podemos classificá-los quanto ao número de átomos de carbono: triose (3 carbonos),

tetrose (4 carbonos), pentose (5 carbonos), hexose (6 carbonos) (NELSON; COX, 2011; LEHNINGER, 1991) (**FIGURA 2**).

FIGURA 2 - Exemplos de monossacarídeos (aldoses) de 3 a 6 carbonos. Triose (D-Gliceraldeído); Tetrose (D-Eritrose); Pentose (D-Xilose) e Hexose (D-Glicose).

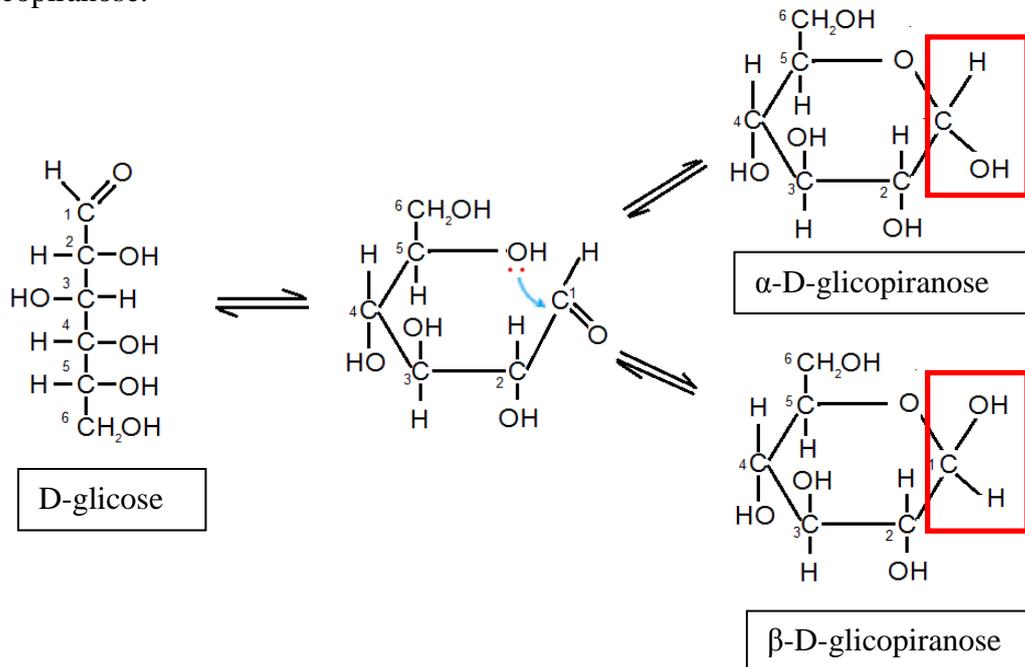


Fonte: Nelson e Cox (2011).

Todos os monossacarídeos, com exceção do diidroxiacetona, contém um ou mais átomos de carbonos assimétricos e ocorrem em formas isoméricas opticamente ativas. Quando existe um monossacarídeo que possui dois isômeros diferentes ou enantiômeros, por convenção um é chamado de isômero D e outro isômero L. E o açúcar mais abundante na natureza é uma hexose conhecida como D-glicose, (NELSON; COX, 2011; LEHNINGER, 1991).

Em solução aquosa os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono ocorrem predominantemente em forma cíclica (em forma de anel), formando derivados hemiacetais ou hemicetais. No caso da D-glicose ocorre em solução onde o hemiacetal do grupo hidroxil livre do C-5 reage com o C-1 do aldeído, gerando o carbono assimétrico e produzindo dois estereoisômeros designados α e β . Chama-se de designação α quando o grupo hidroxila do centro anomérico está em uma projeção de Fisher, no mesmo lado que o grupo hidroxil ligado ao centro quiral mais distante, enquanto que β indica que esses grupos estão em lados opostos, e estes compostos com anéis de 6 membros são chamados de piranoses, pois se assemelham ao pirano (NELSON; COX, 2011; LEHNINGER, 1991) (**FIGURA 3**).

FIGURA 3 - Formação das duas formas cíclicas da glicose: α -D-glicopiranoose e β -D-glicopiranoose.



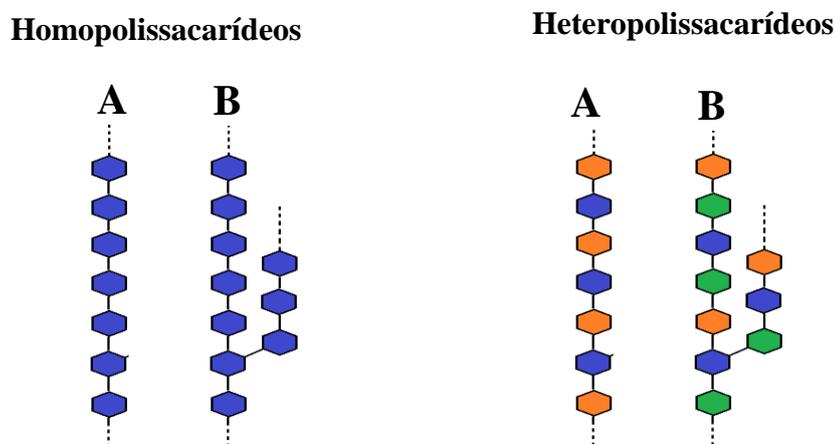
Fonte: Nelson e Cox (2011).

Os oligossacarídeos são formados por unidades de cadeias curtas de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Os mais comuns na natureza são os dissacarídeos (com duas unidades de monossacarídeos). Um dissacarídeo típico é a sacarose (NELSON; COX, 2011; LEHNINGER, 1991).

Os polissacarídeos são considerados polímeros de origem natural que podem ser constituídos por mais de 20 unidades de monossacarídeos, sendo que alguns possuem centenas ou milhares de unidades. Os polímeros de açúcares simples como a glicose, apresentam três funções principais: reserva energética, componentes estruturais de parede celular, tanto em bactérias como em plantas, e atuam no reconhecimento extracelular que se ligam a outras proteínas (NELSON; COX, 2011). Alguns polímeros mais curtos ligados a proteínas de membrana servem como sinais celulares específicos (NELSON; COX, 2011).

Os polissacarídeos diferem uns dos outros em relação às unidades monossacarídicas repetidas, os homopolissacarídeos contêm somente uma unidade monomérica, enquanto que os heteropolissacarídeos contêm dois ou mais tipos diferentes (NELSON; COX, 2011) (**FIGURA 4**).

FIGURA 4 - Homo e Heteropolissacarídeos: (A) polissacarídeo não ramificado e (B) polissacarídeo ramificado.



Fonte: Nelson e Cox (2011).

2.1.1 Ação Biológica Dos Carboidratos Encontrados Na Natureza

Os polissacarídeos são capazes de estimular o sistema imune como modificadores de respostas biológicas, igualmente responsáveis por ações antitumorais que estão intrinsecamente relacionados a fatores como o grau de ramificação, estrutura da cadeia e massa molecular (BOHN; BEMILLER, 1995; GADÊLHA, 2001; SOMENSI, 2014). Existem mecanismos de ação de polissacarídeos encontrados em algas verdes que estão centrados na potencialização do cofator de heparina-II (HAYAKAWA et al., 2000; SILVA, 2008), enquanto outras ações estão centradas a partir da ligação do carboidrato em receptores do complemento 3 (CR3, CD11b/CD18) de fagócitos e Células Naturais Killers (NK) (ROSS et al., 1999, DABA; EZERONYE, 2003).

Uma característica notória nos polissacarídeos é quanto a sua carga iônica, pois podem ser classificados como: neutros, aniônicos ou catiônicos. Estas propriedades são formadas a partir da presença de grupamentos carboxila, amino ou sulfeto, essas propriedades conferem importantes atividades biológicas, sejam antioxidantes ou atininflamatórias (MARGARITIS; PACE, 1985; MELO, 2003). Os polissacarídeos sulfatados são bastante comuns em macroalgas, em tecidos animais e vegetais. Em glicosaminoglicanos a sulfatação ocorre em diferentes posições das unidades dissacarídicas (RODRIGUES; FARIAS, 2009). Já nas macroalgas as carragenanas e agaranas encontradas em algas vermelhas e as fucanas nas algas marrons são bastante utilizadas na atividade anticoagulante e antitrombótica (JIAO et al., 2011).

Nas plantas o polissacarídeo mais conhecido é a celulose, que confere resistência, rigidez, impede o inchamento celular e a ruptura da membrana plasmática. A sua estrutura é formada por unidades de D-glicose com ligações β (1 \rightarrow 4). Ela é sintetizada por um complexo esquema enzimático que monta as cadeias de celulose pela membrana plasmática, com uma parte posicionada para ligar o substrato, UDP-glicose, no citosol e uma outra parte estendendo-se para fora, que é responsável pelo alongamento e cristalização das moléculas de celulose no espaço extracelular (NELSON; COX, 2011). Nas paredes celulares também são encontrados polissacarídeos neutros (que não possuem carga), como as galactanas, arabinogalactanas e arabinanas que costumam estar associadas a pectinas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Nos vegetais, o amido é a forma principal de reserva de carboidratos, sendo constituído de uma mistura de amilose (polissacarídeo linear) e amilopectina (polissacarídeo de estrutura ramificada), são polímeros de α -D-glicose. Algumas plantas armazenam não somente o amido, mas também a inulina. As inulinas são caracterizadas por polímeros formados por cadeias de frutose com um grupo glicose terminal, não é digerida por enzimas no intestino humano, mas são fermentadas por micro-organismos intestinais (MANO; MENDES, 2011).

Da mesma forma que as plantas, algumas bactérias possuem paredes celulares espessas e rígidas que protegem da lise osmótica, como os peptideoglicanos. Eles são formados por um copolímero linear de N-acetilglicosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (Mur2Ac) alternados com ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) e com ligações cruzadas com peptídeos curtos ligados ao Mur2Ac (NELSON; COX, 2011). Além do peptideoglicano, os micro-organismos também secretam polissacarídeos na superfície celular, ou para o meio, definidos como exopolissacarídeos. Estes polímeros têm a função de formar agregados organizados e hidratados, que conferem às células uma série de vantagens seletivas, tais como retenção de íons e nutrientes, resistência à dessecação, proteção mecânica, além da adesão a superfícies (LAUDARES et al., 2010).

2.2 SÍNTESE, ESTRUTURAS E APLICAÇÕES DE EXOPOLISSACARÍDEOS

A síntese do exopolissacarídeo envolve três fases, sendo a primeira fase de assimilação do carbono disponível no meio, a segunda fase de produção de síntese intracelular e a terceira fase está relacionado à liberação do EPS para fora da célula. Os micro-organismos costumam produzir esse biomaterial com a função de adesão da célula e consequente

formação e manutenção da colônia a partir de biofilmes (CZACZYK; MYSZKA 2007; LUNA 2016).

Existem quatro vias conhecidas da produção de exopolissacarídeo em bactérias. A primeira via é dependente de flipases e polimerases Wzx/Wzy; estas enzimas estão envolvidas na translocação de unidades repetitivas do polissacarídeo para a outra face da membrana plasmática (BENTLEY et al., 2006; FERRI, 2013). A segunda via são com transportadores de açúcar dependentes de ATP (ATP binding cassette transportes ou ABC-transporters), a partir de uma bomba de efluxo localizada na membrana interna e periplasmática, típica de bactérias Gram-positivas, sendo esta via comum na cápsula bacteriana como em *Streptococcus pneumoniae* para produção de açúcares. A terceira via é dependente de sintase e está ligada, frequentemente, à montagem de homopolímeros que requerem apenas um tipo de açúcar, como no caso das curdlanas. A quarta via é dependente de síntese extracelular por meio da enzima sucrase (SCHMID; SIEBER; REHM, 2015).

Os principais polissacarídeos são do tipo glucana e apresentam unidades repetidas de D- anidro-hexose e podem conter ou não grupos substituintes ligados ao anel glicopiranosídico unidos através de ligações α ou β . Eles são bastante comuns na parede celular de alguns vegetais, e podem ser isolados de micro-organismos (fungos e bactérias). São formados por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 4) (SOMENSI, 2014).

Nos fungos, as glucanas geralmente estão associadas a proteínas, lipídios e outros carboidratos, e, assim, excretadas para o meio (SILVA et al., 2006). As glucanas são responsáveis pelas ações: antiproliferativa, imunomodulatória e antioxidante, hipocolesterolêmica e hipoglicemiante (SOMENSI, 2014; TÚRMINA, 2012).

Os EPS mais estudados na literatura são: xantana, dextrana, gelana, curdlana (ÖNER, 2013; MANO; MENDES, 2011).

A xantana foi descoberta inicialmente em 1950 por pesquisadores do Northern Regional Research Laboratory (NRRL) que tinham como objetivo na época de identificar micro-organismos que produzissem gomas de interesse comercial solúveis em água. A goma xantana é o nome que se dá ao polissacarídeo do tipo celulose com ramificações não vicinais, produzido principalmente pela bactéria fitopatogênica do gênero *Xanthomonas* (MANO; MENDES, 2011; BORGES; VEDRUSCOLO, 2008).

Esse EPS é constituído de uma cadeia principal 1,4 β -D-glicose com ramificações a cada dois anéis em posição 3,1 de 3 unidades de α - D-manose-6-acetilada, β -D-ácido glicurônico e β -D-ácido 4,6 manosil-pirúvico (MANO; MENDES, 2011). A goma xantana não é metabolizada pelo organismo humano e serve para fins alimentícios dietéticos, mas não

consegue geleificar facilmente. No Brasil existem várias gomas xantanas, por isso sempre existe a busca por uma cepa que consiga produzi-la e competir com os produtos agora comercializados (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; BORGES; VEDRUSCOLO, 2008).

A goma dextrana foi um dos primeiros EPS produzidos em escala comercial e sua produção iniciou-se na Suécia. Esse polímero era encontrado muitas vezes em processos industriais e quando foram examinadas por microscopia, foi visto que se tratava de células encapsuladas pertencentes, principalmente, ao gênero *Leuconostoc*. Na época perceberam que algumas cepas do gênero *Streptococcus* também eram capazes de sintetizar, a partir de sacarose e rafinose, um carboidrato semelhante ao dextrano. Sua cadeia é semelhante à amilose, formada basicamente por um homopolímero linear com ramificações nos pontos 1,3- α ou 1,4- α . Sua unidade principal é constituída de ligações do tipo α -1,6 glicosídicas, e sua síntese é decorrente da enzima dextrana-sacarase em presença de sacarose no processo fermentativo (MANO; MENDES, 2011),

A gelana é um exopolissacarídeo produzido principalmente por bactérias da espécie *Pseudomonas elodea*, antigamente conhecida como *Auromonas elodea*. Este micro-organismo foi identificado por uma empresa chamada Kelco (1978), a partir de um programa de triagem de bactérias do solo e da água (MORRIS; NISHIMARI; RINAUDO, 2012).

A gelana é formada por segmentos de 1,3 β -D-glicose, 1,4 β -D ácido glicurônico, 1,4 β -D-glucose e 1,4 β -L-ramnose. Ela pode ser utilizada no campo alimentício como espessante e geleificante, além de ser bastante utilizada como estabilizante em vários ramos industriais (MANO; MENDES, 2011).

Curdiana é um polissacarídeo produzido por bactérias do gênero *Alcaligenes* e *Agrobacterium*. A curdlana tem uma característica única, com a capacidade de formar um gel firme, resiliente e termo-irreversível quando aquecido em suspensão aquosa superior a 80°C (NAKAO et al., 1991). Este é um homopolissacarídeo linear insolúvel em água, formado principalmente por ligações β -D-glicose. Sua aplicação se estende potencialmente no suporte para imobilização de enzimas, na fabricação de bioplásticos e em processos de adsorção de metais (MANO; MENDES, 2011).

A welana são exopolissacarídeos ramificados que não produzem gel e são sintetizados principalmente por *Sphingomonas spp*. A goma welana consiste de unidades tetrassacarídicas de L-raminose ou L-manose e foi reportado boa viscosidade em temperatura elevada e na presença de cloreto de sódio. Ela também é bastante utilizada na indústria de alimentos (GAO, 2016). Esta, ainda, é aplicada em diversos ramos industriais como na fabricação de cimento, concreto, tinta e pigmentos (MANO; MENDES, 2011).

2.2.1 Importância De Exopolissacarídeos Nas Indústrias

OS EPS são largamente usados em vários ramos industriais, tais como alimentício, químico, farmacêutico, ambiental, biomédico, entre outros (ZHU; DU; XU, 2016). Na indústria de alimentos, os EPS podem ser utilizados como espessantes, emulsificantes, estabilizantes e ainda na formulação de produtos de confeitaria, como confeitos, geleias, alimentos lácteos (sorvete, milk shake e iogurte), balas, gelatinas, produtos derivados de origem animal e como aditivos em alimentos ou bebidas probióticas. (ALI, 2009; ZHU; DU; XU, 2016). Podem ainda ser usados na preparação de alimentos destinados a vegetarianos, em alimentos congelados como crioprotetores e como aditivos na ração de animais (WANG et al., 2008a)

Na indústria de cosméticos, o β -glucano pode ser utilizado em cremes, unguentos, e já foi comprovada a sua eficácia na indução da formação de colágeno e por reduzir as linhas de expressão, rugas, celulite, acne, dermatite, eczema, psoríase, e por tratar de outras condições da pele. O β -glucano pode atuar também como um hidratante formador de filme cicatrizante de feridas e ainda contribuir no antienvhecimento e revitalização da pele e do cabelo (CHO et al., 2014; (ZHU; DU; XU, 2016).

Na indústria farmacêutica, já foram realizados vários ensaios clínicos com os β -glucanos para testar seus efeitos gerais sobre a saúde, entre eles o da administração oral *in vivo*. Já foi comprovada sua ação cicatrizante no revestimento de feridas, onde o mesmo pode ser utilizado em forma de filmes como substituto temporário de pele e como scaffolds na engenharia de tecidos (JIMÉNEZ, NIELSEN; LINDENSTROM, 2012). Nas vacinas, podem ser usados como adjuvantes, imunomoduladores, no revestimento de cápsulas e outros medicamentos que passam pela via oral, além da formulação de medicamentos por apresentarem ação antioxidante e antitumoral (VETVICKA & VETVICKOVA, 2012; ZHU; DU; XU, 2016). Uma aplicação deste exopolissacarídeo é atuar na produção de outros biomateriais, como plastificantes (ADEODATO et al., 2011).

2.3 KEFIR

O termo kefir é designado para uma associação microbiana cuja fermentação se realiza com cultivos de micro-organismos ácido-lácticos elaborados a partir de grãos contendo *Lactobacillus kefiri*, e várias espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* que produzem compostos como ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (LOPITZ-OTSOA

et al., 2006). Esta associação microbiana diversificada de bactérias e leveduras encontra-se na

Tabela 1.

Tabela 1 - Micro-organismos encontrados no Kefir

| Tipos de micro-organismos onde foi encontrado o kefir | Micro-organismos identificados | Referência | |
|--|---|--|--|
| Bactérias ácido-láticas | <i>Lb. Brevis</i> | Angulo et al. (1993) Simova et al. (2002) | |
| | <i>Lb. viridescens,</i> <i>Lb. gasseri,</i> <i>Lb. fermentum,</i> <i>Lb. Casei</i> | Angulo et al. (1993) | |
| | <i>Lactobacillus (L.b)</i> | Angulo et al. (1993) Marshall; Cole; Brooker (1984) (Toba; Abe; Adachi 1987) | |
| | <i>Lb. kefir</i> | Takizawa et al. (1994) | |
| | <i>Lb. kefiranofaciens</i> | | |
| | <i>Lb. kefirgranum, Lb. parakefir</i> | | |
| | <i>Lactococcus</i> | <i>Lactococcus lactis subps. lactis</i> Bolla et al. (2013) | |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LIN; CHEN; LIU (1999) | | |
| Bactérias ácido-acéticas | <i>Acetobacter</i> | | |
| | <i>Acetobacter sicerae sp. nov.</i> | Li et al. (2014) | |
| Fungos | Leveduras | | Simova et al. (2002) Guzel-Seydim et al. (2005) |
| | | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | Brasil (2007) |
| | | <i>Saccharomyces omnisporus</i> | Ninane, Mukandayambaje; |
| | | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Berben (2007) |
| | | <i>Saccharomyces exiguus</i> <i>Candida torulopsis</i> | Yuksekdag; Beyatli; Aslim (2004) |

O kefir teve sua origem nas montanhas de Cáucaso e a história sugere que os caucasianos descobriram a fermentação do leite a partir de bolsas de couro que resultavam em uma bebida enervante (IRIGOYEN et al., 2005).

O kefir pode ser cultivado utilizando diferentes fontes de carbono, como a lactose presente no leite (GUL et al., 2015), tanto em leite de vaca, como em leite de soja (HESENKAS et al., 2011) ou em açúcar mascavo (MIGUEL et al., 2011).

Na bebida pronta para o consumo, algumas substâncias já foram descobertas como: ácido fórmico, propiônico, succínico, dióxido de carbono, aldeídos, acetona, dentre outros (GÜVEN; GÜVEN; GÜLMEZ, 2003; PAIVA, 2013), contudo, ao mudar o substrato do kefir,

foi observado que o cultivo em leite em relação ao cultivados em leite de búfalos tiveram a variação de rendimento e composição de alguns elementos químicos tais como: o ácido láctico, ácido acético e cítrico (GUL et al., 2015).

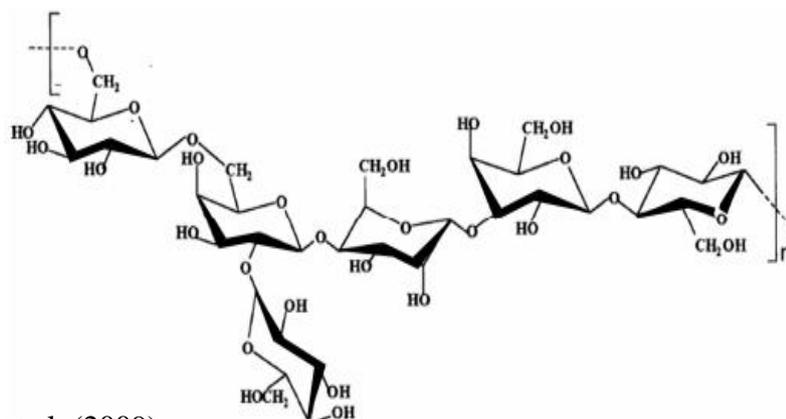
A produção do kefir envolve um processo complexo e difícil de manter a estabilidade da composição química. Quando cultivados em sacarose, na presença ou não de frutas, geram partículas translúcidas, dependendo do açúcar utilizado, no caso do mascavo formam grãos com coloração marrom. O kefir quando cultivado em leite pode gerar partículas brancas ou amareladas (PAIVA, 2013; FONTÁN et al., 2006). E os seus grãos apresentam formatos diferentes, que variam entre 2-3 cm de diâmetro, cobertos por uma matriz polissacarídica (PAIVA, 2013).

Em relação à atividade biológica do kefir alguns estudos em camundongos indicaram que, quando os camundongos foram irradiados, houve proteção das células nas criptas da mucosa do cólon contra apoptose (MATSUU et al., 2003). Liu; Chen; Lin (2005) sugeriram, também, que o kefir de leite e soja conferem significativa atividade antimutagênica e antioxidante e, por isso, é atuante contra mutação e danos oxidativos.

Alguns exopolissacarídeos já foram isolados de grãos do kefir, e têm sido alvo de vários estudos biotecnológicos (WANG et al., 2008b; WANG et al., 2010). A kefirana é um exemplo desses EPS que apresentaram atividade antimicrobiana e antiinflamatória em feridas de ratos infectados (DIAS et al., 2016; RODRIGUES et al., 2005).

O primeiro exopolissacarídeo estudado no kefir foi intitulado de kefirana, onde fora isolado a partir dos grãos, e este biomaterial era totalmente solúvel em água. Na sua estrutura ele continha proporções aproximadamente iguais de resíduos de galactose e glicose (KOOIMAN, 1968), como visto na **FIGURA 5**.

FIGURA 5 - Estrutura da kefirana esquematizada a partir do trabalho encontrado



Fonte: Vu et al. (2009).

Outros exopolissacarídeos provindos do kefir foram descobertos e, dependendo da fonte de carbono podem produzir diferentes tipos de EPS, situado na **Tabela 2** (FIORENTINI et al., 2011; AHMED et al., 2013; GHASEMLOU, et al 2012).

Tabela 2 - Lista de Polissacarídeos e Monossacarídeos encontrados no kefir

| Polissacarídeo | Monossacarídeos | Micro-organismos produtores | Substrato | Autor(es) |
|--------------------|--------------------------|---|-----------------------|-----------------------|
| Não informado | Gli. | Kefir (associação microbiana) | Leite de soja | Botelho et al. (2014) |
| Não informado | Gal./Gli. | Kefir (associação microbiana) | Leite desnatado | Chen et al. (2015a) |
| Não informado | Man./Ara./Gli./Gal./Ram. | <i>Lb. kefiranofaciens</i> | Leite esterilizado | Jeong et al. (2017) |
| α -glucanas | Gli. | <i>Lb. kefiranofaciens</i> e <i>Lb. satsumensis</i> | Não informado | Paiva et al. (2016) |
| Não informado | Man./Gli./Gal. | <i>Lb. Plantarum</i> | Não informado | Wang et al. (2010) |
| Kefirana | Ara./Gli./Gal./Ram | Kefir (associação microbiana) | Açúcar mascavo e água | Moreira et al. (2008) |

Legenda: Gli.(glicose); Man.(Manose); Ara.(Arabinose); Gal.(Galactose); Ram.(Raminose).

2.4 CÂNCER

O Câncer é um importante problema de saúde pública a nível mundial. Muito se tem investido em medicamentos e na busca de novos agentes antitumorais. O mesmo resulta numa desordem genética a partir de mutações que controlam a multiplicação celular (AMORIM, 2002). Um conjunto de células que resulta em uma divisão anormal do tecido, conhecido como tumor, pode ser classificado como benigno ou maligno. Os tumores malignos podem se propagar gerando metástases, devido ao fato das células, na corrente sanguínea, atingirem outros órgãos (AMORIM, 2002).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), publicou em seu site algumas estimativas da incidência de câncer para o ano de 2016 (FIGURA 6).

FIGURA 6 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.

| Localização primária | casos novos | % | |
|-----------------------------|-------------|-------|--|
| Próstata | 61.200 | 28,6% | Homens  |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 17.330 | 8,1% | |
| Cólon e Reto | 16.660 | 7,8% | |
| Estômago | 12.920 | 6,0% | |
| Cavidade Oral | 11.140 | 5,2% | |
| Esôfago | 7.950 | 3,7% | |
| Bexiga | 7.200 | 3,4% | |
| Laringe | 6.360 | 3,0% | |
| Leucemias | 5.540 | 2,6% | |
| Sistema Nervoso Central | 5.440 | 2,5% | |
| Localização primária | casos novos | % | |
| Mama Feminina | 57.960 | 28,1% | Mulheres  |
| Cólon e Reto | 17.620 | 8,6% | |
| Colo do Útero | 16.340 | 7,9% | |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 10.890 | 5,3% | |
| Estômago | 7.600 | 3,7% | |
| Corpo do Útero | 6.950 | 3,4% | |
| Ovário | 6.150 | 3,0% | |
| Glândula Tíreoide | 5.870 | 2,9% | |
| Linfoma não Hodgkin | 5.030 | 2,4% | |
| Sistema Nervoso Central | 4.830 | 2,3% | |

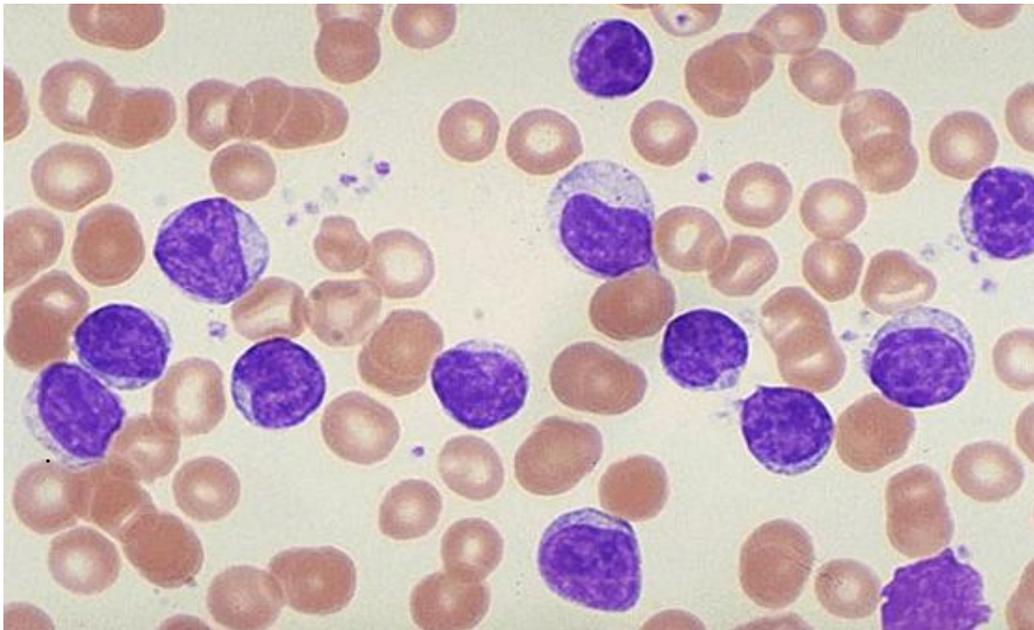
Fonte: INCA, 2017

Segundo o INCA o câncer de maior incidência, com exceção do de pele não melanoma, é o de próstata, seguido de traqueia, brônquio, pulmão nos homens e mama, colorretal e colo de útero nas mulheres. Neste trabalho foi realizada a pesquisa e estudo das seguintes linhagens: leucemia mieloide crônica, adenocarcinoma de mama e carcinoma de laringe humana.

2.4.1 Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica é uma doença que é caracterizada por uma proliferação excessiva da linhagem mielóide. Este é um câncer não hereditário, sendo mais recorrente nos adultos com idade de 50 anos e se desenvolve na medula óssea (INCA, 2003). A leucemia mielóide crônica apresenta leucocitose com acentuada neutrofilia, basofilia, eosinofilia e uma quantidade demasiada de elementos mielóides (Duarte, 2005) (**FIGURA 7**), enquanto que a linhagem K-562 é típica de blastos com diâmetro de cerca de 20µm, não apresentam grânulos e possuem dois ou mais nucléolos.

FIGURA 7 - Esfregaço de um paciente com leucemia mielóide crônica.



Fonte: <http://siric-brio.com> (2017)

O diagnóstico da maioria dos pacientes para essa doença é por apresentar um marcador em suas metáfases conhecido como cromossomo Philadelphia, que resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22. O Ensaio realizado com essas células foram primeiramente denominadas de CML-1, K-562 (LOZIO & LOZIO, 1975)

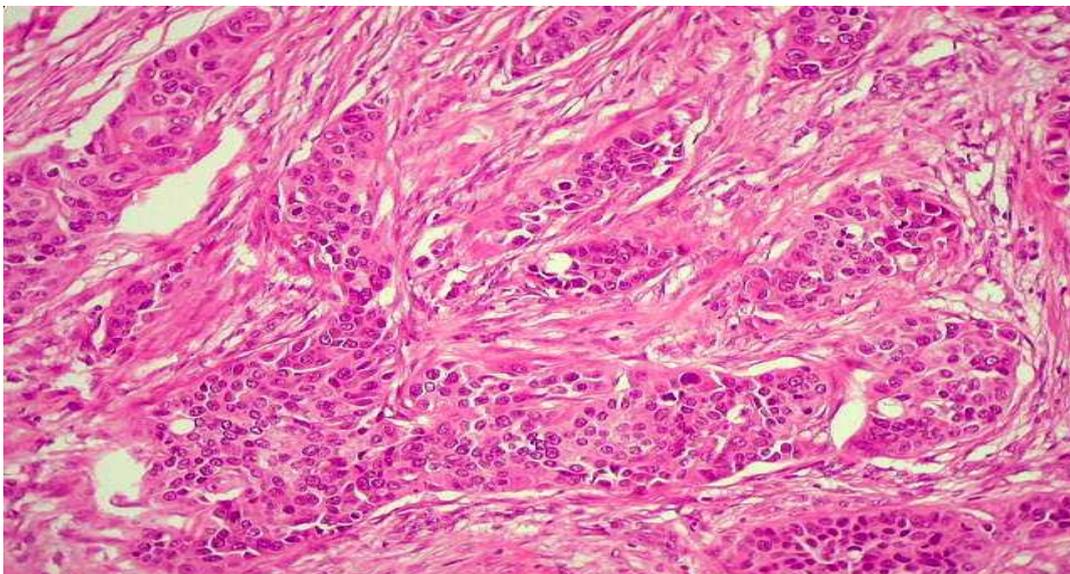
Até o ano 2000, a principal forma de tratamento da LMC era o transplante de medula óssea, porém a partir do ano 2000, o mesilato de imatinibe se tornou disponível no Brasil. Hoje, a droga é utilizada em primeira linha e disponível a pacientes do Sistema Único de

Saúde (SUS). Após mais de dez anos, os resultados são surpreendentes, o que fez especialistas utilizar a expressão “cura funcional”, demonstrando que a sobrevivência global, no Brasil, foi mais de 90%. (HAMERSCHLAK, 2012).

2.4.2 Adenocarcinoma De Mama

O câncer de mama é uma doença que normalmente acomete mulheres na faixa etária entre 49 a 50 anos e, geralmente, acomete as células dos ductos das mamas. O tumor mais comum chama-se carcinoma ductal e os que acometem os lóbulos são chamados de carcinoma lobular, menos frequentes (INCA, 2001) (**FIGURA 8**)

FIGURA 8 - Lâmina histológica de um paciente com adenocarcinoma de mama.



Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/lamneo16.html>

A linhagem MCF-7 foi isolada pela primeira vez em 1970 do tecido mamário de uma mulher caucasiana e possui características de epitélio mamário diferenciado. As células apresentam receptores citoplasmáticos de estrogênio e podem processar o estradiol (LEE et al., 2015). Existem três biomarcadores (ER/PR/ e o HER2) que se tornam padrão no tratamento de pacientes de câncer de mama (NALWOGA, 2010).

Em casos de intervenções preventivas verificaram que a mastectomia bilateral profilática é a intervenção de maior redução de câncer de mama em mulheres portadoras dos genes BRCA1/BRCA2 (PALMERO, 2013).

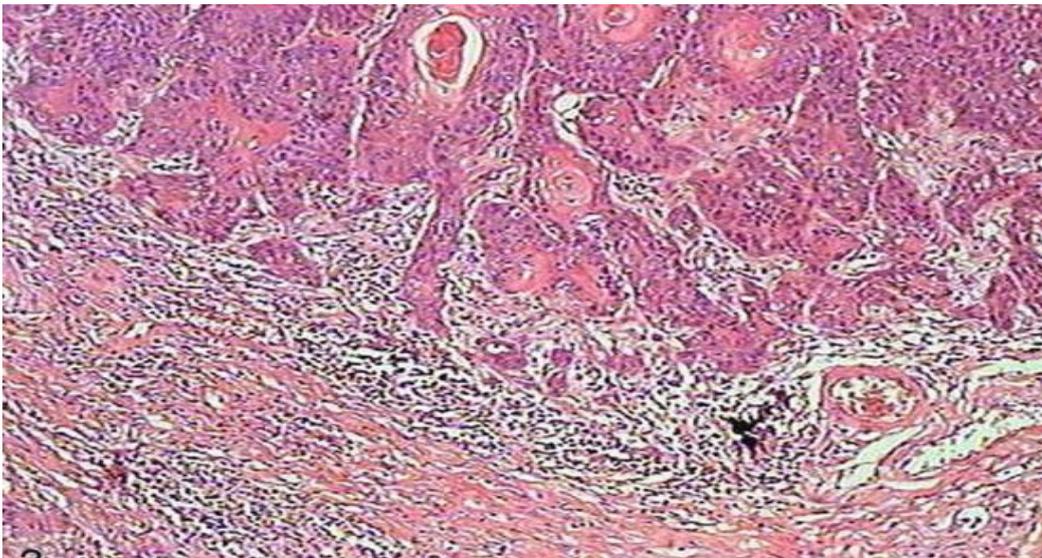
Acredita-se que 90-95% dos casos sejam esporádicos (não familiares), enquanto que 5-10% dos casos sejam hereditários. Para avaliação correta da neoplasia deve-se considerar o

tamanho do tumor, o tipo histológico e a invasão vascular peri-tumoral nos vasos sanguíneos ou linfáticos. O tratamento para este tipo de câncer deve ser ministrado por uma equipe multidisciplinar, sendo a cirurgia e a radioterapia para tratamento loco-regional e a quimioterapia para o tratamento sistêmico (BARROS et al., 2001).

2.4.3 Carcinoma De Laringe Humana

O câncer de Laringe é uma das neoplasias mais comuns das vias aéreas superiores. Nos últimos 20 anos, foi demonstrado a eficácia dos protocolos de radioterapia e quimioterapia em carcinomas localmente avançados da laringe (CARVALHO; MANNARINI; KOWALSKI, 2011). É observada a ocorrência de apoptose e o uso de marcadores proliferativos importantes no prognóstico deste câncer (RIBEIRO et al., 2015) **(FIGURA 9)**.

FIGURA 9 - Lâmina histológica de Carcinoma de Laringe.



Fonte: Ribeiro et al. (2015).

As células Hep-2 (American Type Culture Collection CCL-23) derivadas de carcinoma de laringe humana, quando cultivadas em monocamadas sobre lâminas de vidro, a partir de testes, passaram a ser um ótimo substrato para oferta de auto-antígenos. (DELLAVANCE; ANDRADE, 2012). Os tumores da laringe são avaliados e estudados por meio de exames clínicos e de métodos de imagens. O tratamento para esse tipo de carcinoma seria a radioterapia, que oferece elevada taxa de cura com preservação do órgão e boa

qualidade vocal. Além disso, existem outras técnicas como traqueostomia e aspirações (DEDIVITIS et al., 2011).

2.5 MORTE CELULAR

As células de um organismo precisam de mecanismos de regulação e quando escapam desse processo regulatório, crescem e se dividem desordenadamente e alguns genes são responsáveis em estimular o crescimento em outras células, pois caso sofram mutação servirão de estopim para um crescimento ilimitado e desordenado de outras células, sendo conhecidos como proto-oncogenes (THÉRIAULT, 1998).

A classificação da morte celular depende de sua aparência morfológica, podendo ser apoptótica, necrótica, autofágica ou associada à mitose, de acordo com critérios enzimáticos, aspectos funcionais ou imunológicos (KROEMER et al., 2008).

Na apoptose ocorre um processo coordenado que, pela maioria das vezes, depende de energia, e um grupo de proteases de cisteína (caspases) é ativado formando uma cascata de acontecimentos, onde há uma conexão de estímulos do começo ao fim. Normalmente ocorre no envelhecimento ou desenvolvimento da célula e na manutenção de populações de células nos tecidos, para que haja um mecanismo homeostático. Também ocorre como mecanismo de defesa, em reações imunes ou mesmo na eliminação de células prejudicadas por agentes nocivos e doenças (ELMORE, 2007).

Na necrose a integridade da membrana plasmática é rompida e os conteúdos celulares são degradados por enzimas e liberados (ABBAS; LICHTMAN, 2005). É um processo tóxico em que a célula é uma vítima passiva e morre sem depender de energia (ELMORE, 2007).

A apoptose e a necrose são dois processos que podem ocorrer de forma independente, sequencialmente, ou simultaneamente; o que difere é o tipo ou o grau de estímulos, pois muitos estímulos prejudiciais como, radiação, hipóxia, calor e drogas anticancerígenas citotóxicas podem promover uma apoptose, porém em doses mais elevadas provocam necrose (ELMORE, 2007).

2.6 CULTURA DE CÉLULAS

As células em cultivo são bastante utilizadas como modelo de função fisiológica antes de serem testadas em um modelo animal. Na proliferação *in vitro*, sua adesão celular é reduzida e ela não apresenta características de um tecido *in vivo*; este é o modelo mais usado

em Comissões de Ética de Uso Animais e Pesquisa (ALVES; GUIMARÃES, 2016). A maioria das células vegetais e animais podem se multiplicar ou mesmo expressar propriedades diferenciadas em uma placa de cultura de tecidos e podem ser observadas a partir de microscopia ou bioquimicamente (ALBERTS et al., 2004).

As células tumorais são bastante usadas em ensaios de citotoxicidade e podem ser utilizadas como modelo de função fisiológica antes de serem testadas em um modelo animal. A atividade biológica de vários biomateriais, entre eles exopolissacarídeos (NGUYEN; NGUYEN, 2014) e metabólitos secundários (WINK, 2015) podem ser testados em células tumorais (ALVES; GUIMARÃES, 2016).

Para análise de um material citotóxico é necessário o uso de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]). A técnica é bastante simples e baseia-se na redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT. O material em análise age nas células liberando, ao meio, enzimas mitocondriais, resultando em um produto azul (formazan). Esse produto é quantificado por espectrofotometria e todas as células vivas que apresentam mitocôndrias ativas são usadas nesse ensaio de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

As culturas primárias são preparadas diretamente dos tecidos de um organismo sem proliferação celular *in vitro*, chamada de culturas primárias. Estas células apresentam algumas desvantagens, dentre elas maior dificuldade de obtenção, alto custo, e uma maior possibilidade de contaminação. Quando as células das culturas primárias são removidas da placa e são subcultivadas repetidamente durante semanas ou meses são conhecidas como culturas secundárias (ALBERTS et al., 2004).

No sangue periférico existem células linfóides e mielóides que são fundamentais na análise do sistema imunológico humano. O isolamento de células mononucleares do sangue periférico humano ou PBMC (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) é obtido através da centrifugação do sangue em soluções comerciais como o Lymphoprep, Ficoll Hypaque ou Percoll que contém polissacarídeos e um composto de alta densidade (diatrizoato de sódio). Desta forma, é possível separar células de tipos diferentes conforme a sua densidade por meio da formação de camadas. Após o isolamento das células mononucleares, pode-se fazer a purificação das células presentes de acordo com o tipo desejado sejam linfócitos B, linfócitos T, células *Natural Killer* (NK) ou monócitos (AROSA; CARDOSO; PACHECO, 2012).

2.7 LINFÓCITOS

Os linfócitos são células do sistema imunológico capazes de reconhecer e distinguir especificamente uma grande variedade de antígenos e são responsáveis pela habilidade de memória imunológica e especificidade da resposta imunológica adquirida. Possuem importantes funções como: produção de receptores específicos de alta afinidade para os antígenos, possibilidade da transferência de imunidade contra micro-organismos de pessoas imunizadas para as que não possuem imunidade, produção de respostas *in vitro* através do estímulo de linfócitos em meios de cultura sendo bem semelhantes às respostas *in vivo*, ajuda no diagnóstico de doenças congênitas e adquiridas e de alterações causadas por medicamentos e irradiação por meio da diminuição da quantidade de linfócitos na circulação (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As principais classes de linfócitos existentes são os linfócitos B, que fazem parte da imunidade humoral, sendo ativados e diferenciados em plasmócitos que são capazes de produzir imunoglobulinas, e os linfócitos T, que participam da imunidade celular, onde são ativados para produzir citocinas (BERNE et al., 2000; UNANUE; BENACERRAF, 1986). As células NK (*natural killers*) são linfócitos bem diferentes dos linfócitos B e T por terem receptores distintos e funções de destruição de células tumorais ou células infectadas por vírus, além de desempenhar papel significativo na rejeição de transplantes (CALDER, 1998).

2.8 CITOCINAS

As citocinas são proteínas que são secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa e medeiam várias funções dessas células. Elas podem ser reproduzidas em repostas a micro-organismos ou outros antígenos que medeiam e regulam reações imunes e inflamatórias. A sua secreção costuma ser um evento breve e autolimitado. Abaixo algumas características de citocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

TNF: É o principal mediador da resposta inflamatória aguda contra vários micro-organismos infecciosos, e ainda causa a necrose de tumores *in vivo* (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

IL-2: É um fator de crescimento para linfócitos T estimulador por antígenos e são responsáveis pela expansão clonal das células T após o reconhecimento do antígeno. São responsáveis pela proliferação de células antígeno-específicas, promovem a proliferação e diferenciação de outras células imunes (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

IL-4: É o principal estímulo para produção de anticorpos IgE e para o desenvolvimento de células Th2 a partir de células T auxiliares CD4⁺ naive. Essa citocina consegue estimular a troca de classe de cadeia pesada da Ig da célula B para o isótopo IgE (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

IL-6: Esta citocina atua tanto na imunidade inata e como na adaptativa. A mesma é sintetizada por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblasto e outras células em resposta a micro-organismos. Ela também é responsável pela síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e contribui para o efeito sistêmico da inflamação na fase aguda (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

IL-10: Esta citocina é conhecida por ser um inibidor de macrófago e células dendríticas ativadas e está, portanto, envolvida no controle das reações da imunidade inata e da imunidade mediada por células. Ela também inibe a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas e inibem a expressão de co-estimuladores e de moléculas MHC da classe II em macrófagos e células dendríticas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

2.9 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UM EXOPOLISSACARÍDEO

Após o isolamento de um exopolissacarídeo com atividade biológica, seja ela antitumoral, antioxidante ou antimicrobiana é necessária a investigação estrutural. A partir disso, existe uma série de testes espectroscópicos e cromatográficos que podem elucidar a estrutura em questão.

2.9.1 Espectroscopia Na Região Do Infravermelho

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para a identificação de polissacarídeos. A espectroscopia na região do infravermelho é um método sensível, rápido e permite a análise da amostra sem a necessidade de hidrólise do polissacarídeo em análise. O infravermelho também é um método para a determinação das ligações α ou β -glicosídicas em glicanas e útil como complemento para verificação de proteínas (contaminantes) em amostras de polissacarídeos (SILVA, 2007).

A espectroscopia de infravermelho analisa as vibrações dos átomos das moléculas quando incide uma radiação. O espectro acontece quando a radiação IV incide na amostra e parte da mesma é absorvida. A energia de cada pico do espectro corresponde à frequência de

vibração da molécula. A espectroscopia FTIR (Fourier Transform Infrared) é um dos métodos mais utilizados para a identificação de polissacarídeos. Esta técnica permite a análise qualitativa de compostos orgânicos que em frequências específicas são influenciadas pela presença de grupos funcionais próximos (RUSCHEL et al., 2014).

O ATR (Reflectância Total Atenuada) é uma técnica de escolha para análise de da superfície de vários polímeros. O ATR é utilizado a partir de um cristal com índice de refração muito elevado e baixa absorção na região do infravermelho. Esta técnica consegue analisar sólidos e líquidos e não precisa existir um preparo da amostra. A profundidade de penetração do feixe depende de diversos fatores, entre os quais ângulo de incidência e índice de refração da amostra. Para que a técnica seja bem sucedida, a amostra deve estar em contato direto com o cristal ATR e o índice de refração da amostra devem ser maiores do que a amostra em análise, por isso é seguro assumir que a maioria dos sólidos e líquidos tem índices de refração muito baixos (SOUZA, 2009).

O resultado do infravermelho é normalmente expresso em número de onda (cm^{-1}). Os polissacarídeos apresentam uma grande quantidade de grupos O-H e apresentam bandas largas intensas próximo a região de 3300 cm^{-1} e próximo de 1080 cm^{-1} pelo estiramento C-O (LEITE, 2008).

2.9.2 DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) E TG (Termogravimetria)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG) fornecem propriedades térmicas e implicam na detecção da variação da massa da amostra em função da temperatura. Estas técnicas são bastante utilizadas para a caracterização de filmes, blendas, polissacarídeos e outros biopolímeros. Uma das aplicações desses estudos são análises quanto a estabilidade e decomposição térmica (ANDREANI, 2005).

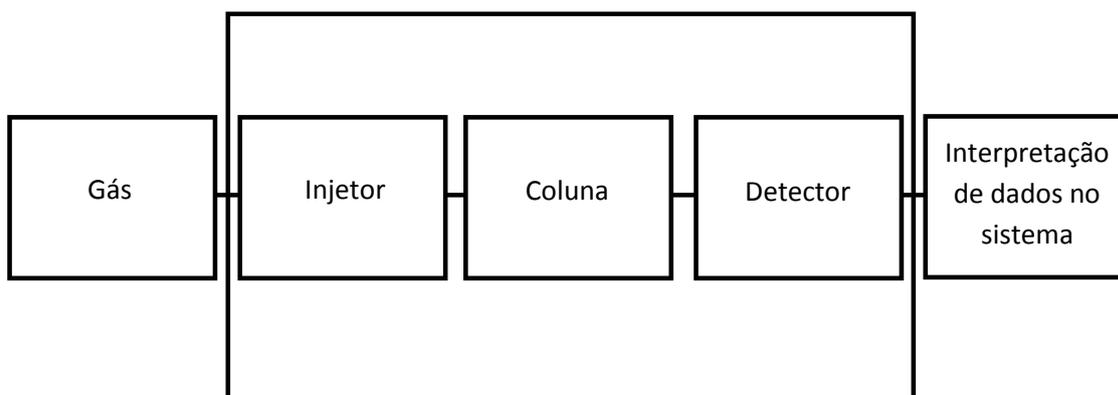
O TG é uma técnica que permite analisar a variação de peso da amostra em função da temperatura. Ela pode ser classificada como dinâmica (ou não- isotérmico), onde a massa é registrada gradativamente quando a temperatura aumenta a uma razão constante ou linear, isotérmico quando a variação da amostra é registrada em função do tempo e a temperatura mantém-se constante e quase isotérmico quando a amostra começa a perder a massa e a temperatura é mantida até que a massa se estabilize. Essa técnica costuma ser utilizada para a determinação de pureza das amostras e na estabilidade de fármacos e medicamentos (PEREIRA, 2013).

O DSC é uma técnica que permite medir a diferença de energia de uma substância a um material de referência, termicamente em função da temperatura; enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Existem duas modalidades: a calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência e calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor (PEREIRA, 2013).

2.9.3 Cromatografia Gasosa

A Cromatografia é um método físico de separação de substâncias no qual duas fases estão envolvidas, uma fase móvel e uma fase estacionária. Na cromatografia gasosa (CG) a separação de compostos voláteis, a fase móvel é um gás de arraste que arrasta os analitos para dentro do sistema, sendo o nitrogênio, hélio, hidrogênio e argônio os principais gases de arraste e a fase estacionária está situada internamente na coluna.

A técnica abordada no CG é da seguinte forma: a amostra é volatilizada e injetada na coluna cromatográfica, e após isso o material eluído é levado por um gás inerte (fase móvel). Essa fase móvel do qual o gás é contido não interage com a amostra analisada e sua única função é de transporte. Apesar de existirem vários modelos de cromatógrafos gasosos, existem dois tipos de cromatografia gasosa: gás-líquido e gás-sólida (pouco convencional). A eficiência do CG depende do tamanho da amostra e da velocidade de injeção. Após passar pelo injetor a amostra é levada para a coluna cromatográfica e o seu forno, pois a temperatura da coluna é um parâmetro bastante importante. Este deve ser controlado com maior precisão. A temperatura ótima depende do ponto de ebulição do analito e do grau da sua resolução. Um detector para a cromatografia gasosa ideal deve ter baixo limite de detecção, resposta linear com a concentração, calibração simples, resposta uniforme e ter um nível de ruído baixo. Após análise do detector o sinal é amplificado e registrado no computador (SKOOG et al., 2006) **(FIGURA 10)**.

FIGURA 10 - Diagrama de um cromatógrafo a gás.

Fonte: Eiceman, 2006.

A metilação é uma técnica aplicada no CGMS que permite caracterizar um polissacarídeo. Este método determina as ligações glicosídicas, e para isso é fundamental que os polissacarídeos sejam totalmente metilados. O polissacarídeo metilado é hidrolisado, submetido à redução e convertidos em alditóis. Após isso, esses compostos sofrem uma reação de acetilação transformando-se em acetatos de alditóis, onde são analisados por cromatografia gasosa aliada a espectrometria de massas (ALEXANDRE, 2015).

2.9.4 Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear

Uma das formas de caracterizar a estrutura de um EPS é a partir da utilização da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

O RMN explora propriedades magnéticas dos núcleos dos átomos. Os núcleos dos átomos podem ser vistos como pequenos piões carregados que giram em torno do seu eixo gerando o seu próprio campo magnético. Os núcleos que geralmente estão dispostos de forma aleatória sob forte campo magnético se alinham em orientações específicas (LUZYANIN; ABRANTES, 2010). Esta técnica pode ser utilizada em amostras sólidas ou líquidas e o seu preparo é costumeiramente feito a partir de um solvente deuterado (LEAL, 2013).

O princípio da técnica se baseia no fato da amostra poder absorver radiação eletromagnética na região em frequências específicas. Algumas moléculas como o ^1H e ^{13}C possuem spin nuclear quantizado por estarem associados a um campo magnético e comportam-se como barras magnéticas. Após essas moléculas estarem submetidas a um determinado campo magnético externo, ocorrerá uma interação quantizada entre o spin

nuclear e o campo magnético aplicado. Esses núcleos entram em precessão e ocorre o fenômeno da ressonância (MASSARO, 2005).

Em certa molécula os núcleos de hidrogênio podem estar em regiões de maior ou menor densidade eletrônica e em consequência disso absorvem energias em diferentes frequências com campo magnético constante. Os sinais ocorrerão em diferentes posições no espectro de RMN, chamando isso de deslocamento químico. No caso de átomos de hidrogênio, a magnitude relativa de sinais é muito importante, mas o que importa não é a altura do pico, e sim a área abaixo deles (MASSARO, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar um exopolissacarídeo extraído de grãos de kefir cultivados em açúcar mascavo e água e sua atividade citotóxica em células normais e linhagens tumorais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização química do exopolissacarídeo a partir de técnicas como: molish, fenol sulfúrico e Bradford
- Caracterização estrutural a partir de técnicas espectroscópicas (Infravermelho e Ultravioleta) o exopolissacarídeo obtido;
- Caracterização estrutural a partir das técnicas cromatográficas (acetilação e metilação) em CGMS.
- Avaliação da atividade citotóxica do exopolissacarídeo em linhagens tumorais: MCF- 7 (adenocarcinoma de mama humana), K-562 (leucemia mielocítica crônica) e HEP-2 (carcinoma de laringe humana).
- Avaliação da atividade imunomodulatória do exopolissacarídeo em células normais a partir do isolamento de linhagens de células mononucleares de sangue periférico humano.

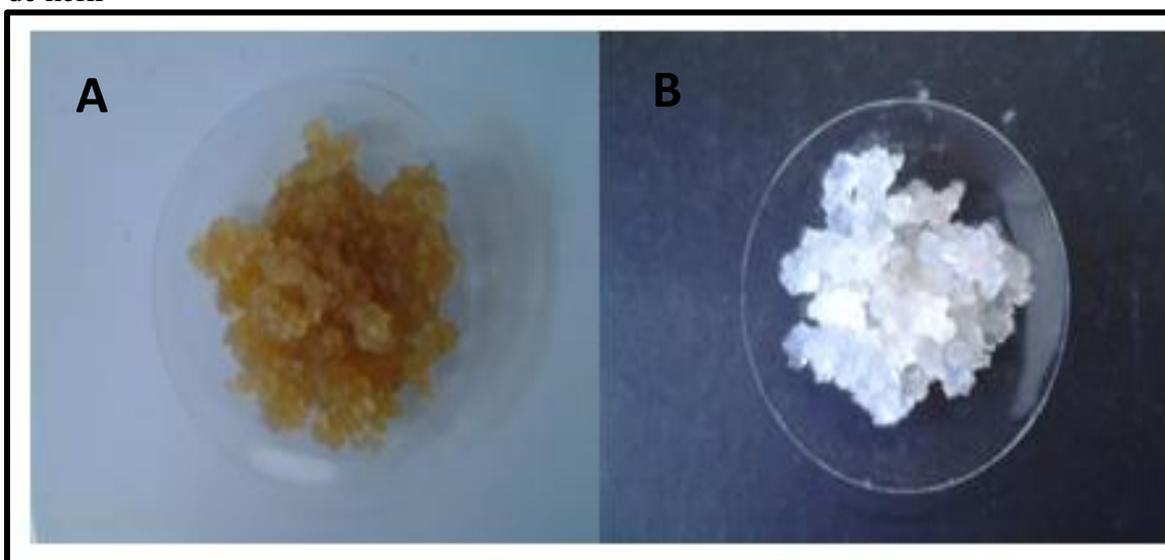
4 MATERIAIS & MÉTODOS

4.1 CULTIVO DO KEFIR

Os grãos de kefir (BIONAT-1), (**FIGURA 11 A**), foram mantidos em 50 mL de solução de açúcar mascavo (50 g.L^{-1} para cada 5g de grãos de kefir) à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 30^{\circ}\text{C}$). O repique da cultura de kefir foi realizado a cada 48h. Após o cultivo, 350g de grãos de kefir foram clareados através de lavagens (12 a 15 vezes com água destilada). As impurezas provenientes do açúcar mascavo foram retiradas manualmente com ajuda de uma pinça e descartadas. Depois de cultivada toda a quantidade de grãos de kefir necessários para realização de todos os testes, os mesmos foram congelados, e uma parte deles foi clareado.

No clareamento (**FIGURA 11 B**), o kefir foi lavado e se retirou as impurezas manualmente com ajuda de uma pinça. Esse processo foi realizado até 15 vezes.

FIGURA 11: (A) Antes do clareamento do grão de kefir ; (B) Depois do clareamento do grão de kefir



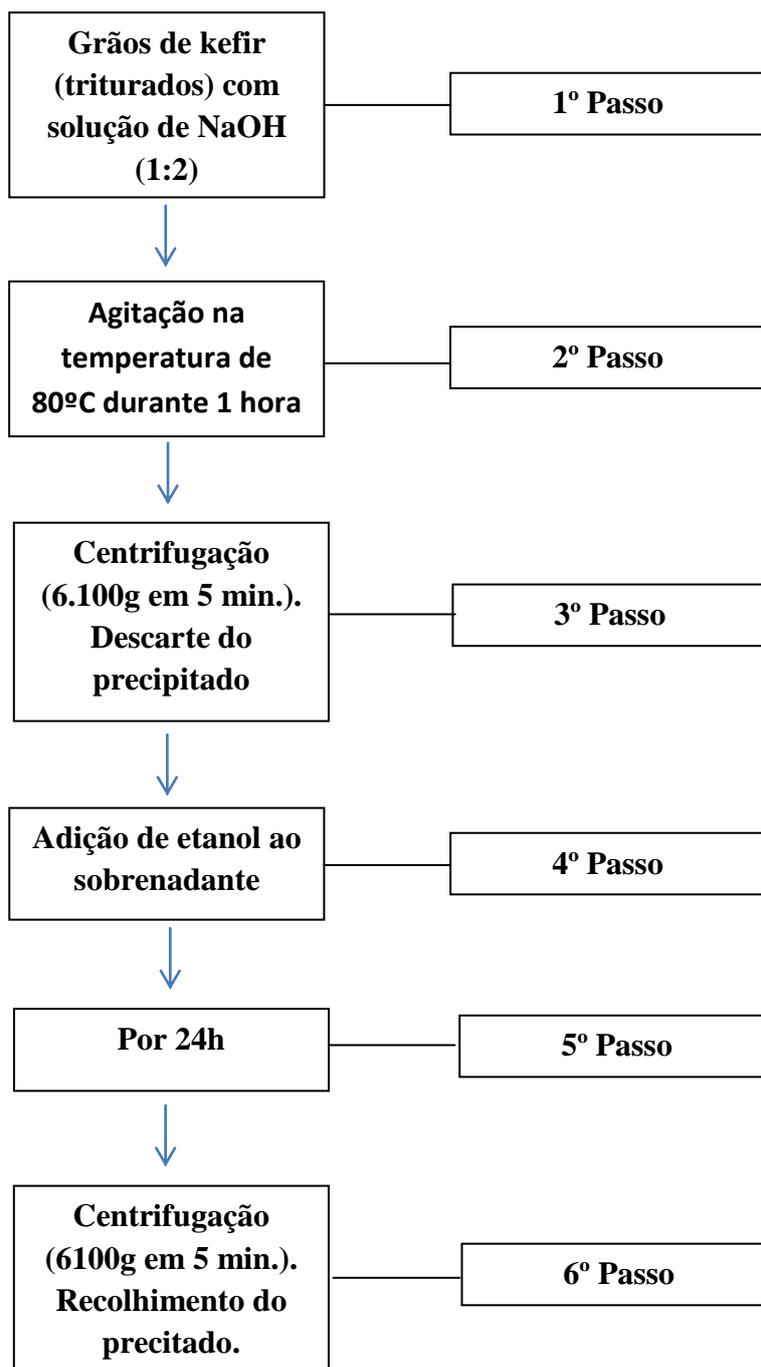
Fonte: O autor (2017)

4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDO DO KEFIR

A extração do exopolissacarídeo foi realizado segundo modificações do protocolo descrito por Moreira et al. (2008). Após o clareamento, os grãos foram triturados e acrescentou-se água tipo I (MliQ) até ficar numa consistência gelatinosa. Em seguida, os grãos triturados foram adicionados a um béquer contendo uma solução de NaOH (1,0 M), na proporção de 1:2 (grãos de kefir/NaOH) e a mistura foi mantida sob agitação com temperatura

de 80°C por 1 h. Após este processo, a solução foi centrifugada (6.100 x g) por 5 min e as impurezas precipitadas foram descartadas. Em seguida, o sobrenadante foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto frio e posto a 4°C em overnight. A solução foi centrifugada e o precipitado foi reservado. Esse processo foi repetido por mais três vezes com o precipitado. **Este processo está representado na FIGURA 12 a seguir:**

FIGURA 12: Processo de extração e purificação do exopolissacarídeo



Fonte: O autor (2017)

Após essa 1ª Etapa foi iniciada uma nova repetindo-se o passo 1 (somente adicionando a solução de NaOH), passo 2, passo 4 e passo 6. Esta nova etapa foi feita 3 vezes. Em seguida adicionou-se água tipo I (MliQ), após isso foi feito o processo de neutralização.

4.3 TESTES DE CARACTERIZAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO

4.3.1 Teste De Molisch

O Teste de Molisch foi usado para confirmar a presença de carboidrato. Para tanto, foi preparada uma solução de 5 mg/ 5mL de polissacarídeo acrescido de 3 gotas de alfa-naftol a 5%, em seguida foi adicionado 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), sendo acrescentado com o tubo inclinado e lentamente. A ocorrência de um anel roxo indica a presença de açúcares (KASSAKUL, et al 2014).

4.3.2 Teste De Bradford (Doseamento De Proteínas Totais)

Para analisar o grau de contaminação proteica de um polissacarídeo, um dos métodos comumente utilizados é a dosagem de proteínas totais, realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a quantificação de proteínas nas amostras, inicialmente foi realizada uma curva de calibração utilizando-se a albumina de soro bovino nas concentrações de (1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/ml) em triplicata. Em seguida, em local sem irradiação direta de luz, foram pipetados e homogeneizados em microplaca 20 µl da amostra (padrão) de cada uma das concentrações, 1580 µl de água tipo I (MliQ) e por último, 400 µl do reagente de Bradford, o branco foi água + Bradford (1600 µl + 400 µl, respectivamente). Passados 10 minutos para que ocorresse a reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm para a plotagem do gráfico e análise do coeficiente de correlação (R). A quantificação de proteínas nas amostras de polissacarídeos foi realizada nas concentrações diluídas e em triplicata de (30; 20; 10; 5 e 2,5 µl) + água tipo I (130, 140, 150, 155 e 157,5 µl) e logo após foram adicionados 40 µl do reagente de Bradford às soluções, sempre protegidos da luz. O branco foi Bradford (40 µl) e água tipo I (160 µl). Posteriormente foi realizada a leitura da medida das absorbâncias em espectrofotômetro a 595 nm (BRADFORD, 1976).

4.3.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-VIS)

Com a finalidade de encontrar possíveis grupos cromóforos oriundos de impurezas, o polissacarídeo foi diluído em água tipo I (1mg/ml) com auxílio de um sonificador e analisado em Espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) na região compreendida entre 200 -700nm.

4.3.4 Espectroscopia Infravermelho Por Transformada De Fourier (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais do exopolissacarídeo extraído dos grãos de kefir foi realizada utilizando um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Agilent Technologies Cary 630FITR), módulo ATR. A amostra (10mg) foi prensada e os espectros de transmissão foram coletados mediante resolução de 8, 4 scans, sob uma varredura de 4000 a 750 cm^{-1} de radiação infravermelha.

4.3.5 Teste De Fenol Sulfúrico (Dubois)

O método baseia-se no fato de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados e após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos existirá a formação de produtos com o fenol. Esta mudança de cor é medida na região do visível e é proporcional a quantidade de açúcares presente na amostra. A reação é sensível e de cor estável (VICENTE, 2010). Para esse teste foi feito uma solução padrão de glicose (D-glicose) nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L, onde fora comparados os exopolissacarídeo em análise. Foram preparados 0,5 mL das amostras em 0,5 mL de água destilada, após isso foi adicionado 0,5 mL de fenol a 5% e os tubos foram agitados vigorosamente. Após agitação, adicionou-se rapidamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (98N) pelas paredes dos frascos e o conteúdo foi agitado novamente. O cálculo das quantidades de açúcar total foi realizado através de uma curva analítica obtida, com auxílio do software Origin (DUBOIS et al., 1956).

4.3.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) E Análise Termogravimétrica (TGA)

Os ensaios para o DSC e TGA (30mg da amostra) foram realizados em um analisador térmico simultâneo com capacidade de promover os ensaios de Calorimetria Diferencial Exploratória e Análise Termogravimétrica, modelo STA 6000 (PerkinElmer). O experimento foi realizado numa atmosfera de nitrogênio, fluxo de 50mL min⁻¹, com uma elevação da temperatura de 10°C /minuto até 800°C.

4.3.7 Composição Monossacarídica

Após a hidrólise ácida do EPS (5mg em 5 mol L⁻¹ de ácido trifluoroacético durante 4h a 100°C), os derivados de acetato de alditol foram analisados por cromatografia gas-líquido/espectrometria de massa (GCMS-QP2010 Shimadzu, Japão) (KIRCHER, 1960).

4.3.8 Análise De Metilação

Na metilação, uma alíquota da amostra (10mg) é solubilizada em 1mL de dimetilsulfóxido (CH₃)₂SO. Após a solubilização é adicionado 1mL de iodeto de metila (CH₃I) e, aproximadamente 1mg de hidróxido de sódio onde a mistura reage durante 30 minutos. O EPS foi submetido a duas rodadas de metilação (CIUCANU; KEREK, 1984). O material metilado foi hidrolisado com ácido trifluoroacético 5mol L⁻¹ durante 4h a 100°C, reduzido com boro-hidreto e os alditóis foram acetilados com anidrido acético: piridina (1:1 v/v). Os acetatos de alditol dos açúcares metilados foram dissolvidos em clorofórmio e analisados em cromatografia gasosa/unidade de espectrometria de massa (GCMS-QP2010 Shimadzu, Japão) com uma coluna Restek RTX-5MS. O gás transportador foi o hélio e o gradiente de temperatura utilizado 110°C a 250°C, com variação de 2°C min⁻¹. As temperaturas do injetor, fonte de íons e interface foram 260°C, 200°C e 230°C, respectivamente.

4.3.9 Espectroscopia De Ressonancia Magnetica Nuclear (RMN)

Os espectros unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D) do polissacarídeo foram registrados usando um aparelho Bruker DRX 900 MHz com uma sonda de ressonância tripla. Aproximadamente 20 mg de amostra foram dissolvidos em 0,5 mL de DMSO-d₆ deuterado a 99,9% (Cambridge Isotope Laboratory, Cambridge, MA, EUA). Devido à fraca solubilidade deste polissacarídeo em H₂O, todos os espectros foram registrados a 50°C com DMSO

deuterado exibindo um pico devido à troca com H₂O residual supressão por pré-saturação. Para os espectros de ¹H RMN 1D, foram registradas 32 varreduras, utilizando um atraso de inter-varredura igual a 1s. Os espectros HSQC editados em duas dimensões ¹H/¹³C foram registrados a 50°C com supressão de HOD por pré-saturação, com 256 varreduras. A configuração do número de incremento foi definida para 64, e estados-TPPI foram usados para detecção de quadratura na dimensão indireta e executados com 1024 × 256 pontos com pulsos retangulares de fase alternada otimizados globalmente (GARP) para desacoplamento. Os deslocamentos químicos foram exibidos em relação ao ácido trimetilsililpropiónico externo a 0 ppm para ¹H e em relação ao metanol para ¹³C.

4.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA E ANTITUMORAL DO EPS EXTRAÍDO DOS GRÃOS DE KEFIR

As linhagens neoplásicas MCF- 7 (adenocarcinoma de mama humana), K-562 (leucemia mielocítica crônica) e HEP-2 (carcinoma de laringe humano) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, e mantidas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂, em meios específicos RPMI 1640 (Gibco) e DMEN (Gibco), com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid) (Gibco) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Para o repique utilizou-se tripsina/EDTA (0,25%). As células foram plaqueadas numa densidade de 0,3x10⁵ (linhagem em suspensão) e 1x10⁴ (linhagem aderida), por poço em placas de 96 poços. As linhagens neoplásicas foram tratadas com os compostos na concentração final de 50 µg/mL e, em seguida incubadas por 72 horas. Após este período, 25 µL do MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolio) foi adicionado e as células foram reincubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 100 µL de DMSO em espectrofotômetro de placa a 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPadPrism* 5.0. Para a atividade citotóxica do polissacarídeo foi utilizada a escala do National Cancer Institute (NCI), onde os compostos considerados sem atividade citotóxica apresentaram-se com a inibição porcentual no intervalo de 1 - 20%, aqueles com pouca atividade situam-se entre 20 e 50%, com atividade moderada de 50 para 70% e de alta atividade, quando apresentam um intervalo de inibição entre 70 a 100% (COCCO et al., 2006).

4.5 ENSAIO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA A PARTIR DAS LINHAGENS DE CÉLULAS PRIMÁRIAS

4.5.1 O Isolamento De Células Mononucleares Do Sangue Periférico (PBMCs)

Recolheram-se sangue (4 mL) de 6 voluntários saudáveis jovens (23 a 38 anos), sem doença infecciosa recente, imunossupressão e/ou doença autoimune em tubos de heparina (Vacuette) para obter as PBMCs através de uma técnica de gradiente de concentração (Ficoll-Paque™, GE Healthcare). As células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e após centrifugação (400 g, 30 min, 20°C), obteve-se um anel de PBMC, recolheu-se e as células foram contadas numa câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripano (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram utilizadas apenas quando a viabilidade foi > 98%. As amostras foram coletadas após aprovação de todos os voluntários do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (UFPE, Brasil nº 1.870.360 / 2016).

4.5.2 Cultura De Linfócitos E Estimulação *In Vitro* Com O Exopolissacarídeo

Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com soro bovino fetal a 10% (p/v) (Sigma-Aldrich, EUA) em placas de 24 poços (TPP Techno Plastic Products, Suíça) a uma densidade de 10⁶ células/poço. As culturas de sobrenadantes de linfócitos foram utilizadas em ensaios para avaliar a viabilidade celular, produção de citocinas e libertação de óxido nítrico. Todas as culturas foram tratadas com 50, 25, 12,5, 6 e 3 µg/mL do exopolissacarídeo e permaneceram com este estímulo durante 24h em ensaios para análise de viabilidade celular. Outros ensaios foram realizados utilizando 12,5 µg/mL do exopolissacarídeo em 24h de tempo de incubação. Os controles foram realizados utilizando células não tratadas em meio de cultura.

4.5.3 Análise Da Viabilidade Celular

Linfócitos tratados com exopolissacarídeo durante 24 horas de incubação bem como células não tratadas foram centrifugados a 450g a 4°C durante 10min. Após descartar o sobrenadante, adicionou-se 1mL de PBS1X ao precipitado e após ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (450g, 4°C, 10min). O sedimento foi ressuspensão em 300 µL

de tampão de ligação (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM), transferido para um tubo citométrico marcado e anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1: 500) e iodeto de propídio (PI, 20µg/mL). A anexina V é utilizada como uma sonda não quantitativa para detectar células que expressam fosfatidilcerina na superfície da célula após um evento apoptótico (MEERS; MEALY, 1994). A citometria de fluxo foi realizada em uma plataforma FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, EUA) e os resultados foram analisados usando o software CellQuest Pro (BD Biosciences). A análise da Annexin-FITC negative/PI positive, as células foram consideradas como necróticas e, Annexin-FITC positive/PI negative, as células foram consideradas no estágio inicial de apoptose. Os negativos duplos foram considerados células viáveis.

4.5.4 Medição Da Produção De Citocinas Usando O Kit Cytometric Bead Array (CBA)

Os sobrenadantes de culturas tratadas com o exopolissacarídeo (politol) durante 24 h, assim como células não tratadas, foram recolhidos para quantificar as citocinas e os ensaios de óxido nítrico. A avaliação de citocinas foi realizada utilizando a citocina Th1/Th2 humana II (Becton Dickinson Biosciences, EUA) para detecção simultânea das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e interferon-gama (IFN- γ). A medição de citocinas foi baseada no princípio da tecnologia Cytometric bead array (CBA) e todos os dados foram adquiridos na plataforma FACSCalibur. O CBA utiliza micropartículas ou esferas marcadas com intensidade de fluorescência discreta. As pérolas de captura foram marcadas com alofocianina e foram lidas a 650nm. O anticorpo de detecção específico para citocinas foi marcado com fluorocromo de ficoeritrina que emite a 585nm em parâmetros amarelos. A intensidade de fluorescência do parâmetro amarelo é proporcional à quantidade de citocina presente nas amostras de teste. Resumidamente, amostras de teste (50µL) e anticorpo de detecção de ficoeritrina foram incubadas com reagente de pérola de captura durante 3h no escuro a temperatura ambiente. Todos os anticorpos não ligados foram lavados (1,0mL de tampão de lavagem kit) e ressuspensos em 300µL de kit tampão de fixação antes da aquisição dos dados na plataforma FACSCalibur. Cada citocina tinha um pico único e bem separado e seis curvas padrão de citocina individuais (0-5000 pg / mL) foram executadas em cada ensaio. O intervalo de detecção estava entre 3000 pg / mL e 5000 pg / mL de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados por meio de testes não-paramétricos. Antes da análise, os dados das amostras foram avaliados utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov para indicar se as amostras apresentaram distribuição gaussiana. Para a detecção das diferenças entre os grupos, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Todos os resultados foram expressos como média \pm DP e um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS & DISCUSSÃO

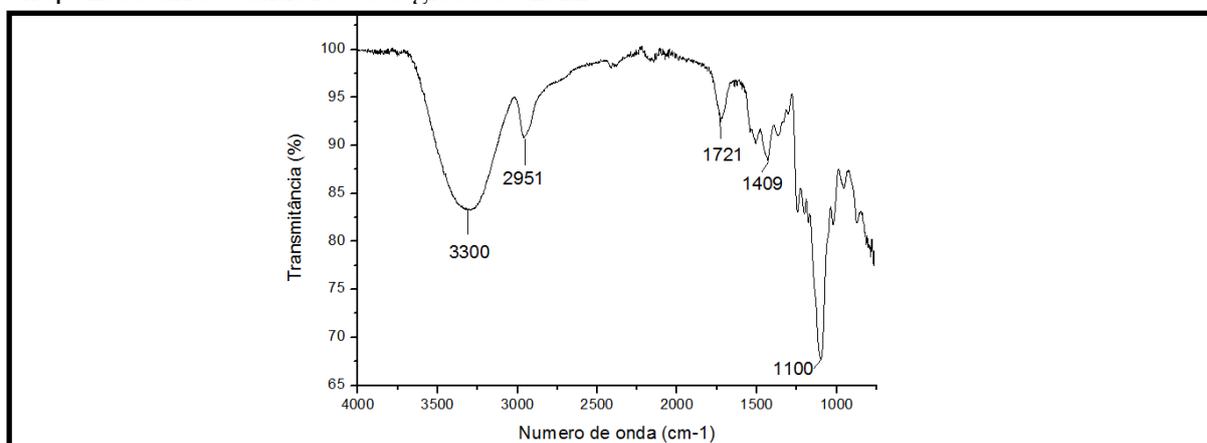
A partir de 350 g de kefir clareado, após a extração em meio alcalino, foram obtidos 28,28g (8,08 %) de massa de fermentado, após o método estabelecido para extração do exopolissacarídeo, Já Moreira et al..(2008) utilizando a extração com água quente obteve um rendimento de 0,1% do fermentado em fase final. Vários autores obtiveram o exopolissacarídeo a partir do isolamento dos micro-organismos contidos no kefir e em semente

de cultura específico, contudo esse trabalho visa a extração do exopolissacarídeo da associação microbiana (MAEDA, et al., 2004a; MAEDA et al., 2004b,; WANG et al., 2015b.) O teste de Molish realizado com o material após a extração indicou a presença de carboidratos, demonstrando assim, que o método de extração alcalina foi capaz de extrair o polissacarídeo. A análise espectroscópica na região do UV-VIS mostrou ausência de proteínas ou grupos aromáticos na amostra, por não apresentar absorções características desses grupos, confirmando a análise feita por Wang et al. (2015b), que também utilizaram UV-VIS para verificar a presença de impurezas presentes na extração de polissacarídeos produzidos por *Lb. plantarum* contido no kefir (WANG et al., 2015b), enquanto que o teste de Bradford evidenciou ausência de proteína no exopolissacarídeo extraído. O teste de fenol sulfúrico apresentou um rendimento de 84,4% de açúcar.

5.1 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais presentes no EPS extraído dos grãos de kefir foi realizada através de FTIR demonstrado na **FIGURA 13**.

FIGURA 13: Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) do exopolissacarídeo extraído dos grãos do kefir.



Fonte: O autor (2017).

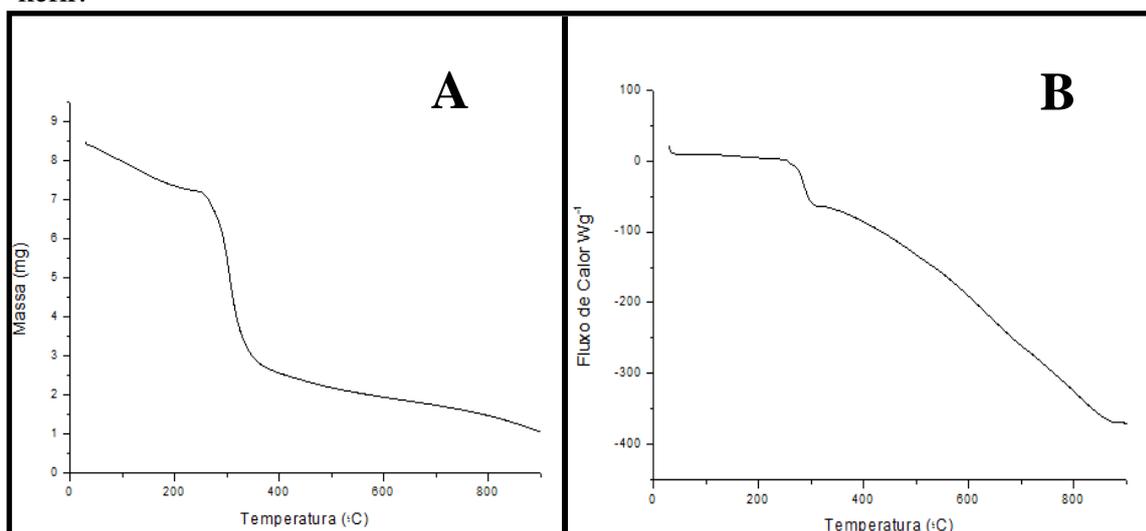
O espectro de infravermelho do exopolissacarídeo extraído dos grãos de kefir apresentou um estiramento largo arredondado a 3300 cm^{-1} indicativo de grupos hidroxila com pontes de hidrogênio, comum a todos os carboidratos. O estiramento em 2951 cm^{-1} é atribuído a ligações C-H típicos de grupos metilados. O estiramento em 1720 cm^{-1} é característico de aldeído (C=O). Bandas entre $1660\text{ e }1220\text{ cm}^{-1}$, aproximadamente, fazem ligações assimétricas e simétricas de ligações C-O (BOTELHO et al., 2014). A região de impressão digital para carboidratos estão na região entre $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, que se associam aos anéis (cíclicos) e

grupos laterais (C-O-C, C-OH e C-H). O estiramento a 1100 cm^{-1} é característico a todos os carboidratos (ESNAASHARI et al., 2014). Essa região anomérica contém bandas que correspondem à vibração esquelética de glicose ($950\text{-}750\text{ cm}^{-1}$), característico de glucanas, encontrada na literatura (SYNYTSYA; NOVAK, 2014).

5.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A caracterização térmica do exopolissacarídeo do TGA (FIGURA 14 A) e DSC (FIGURA 14 B) não apresentou diferença significativa conforme a FIGURA 14.

FIGURA 14: Análise térmica: TG (A) e DSC (B) do exopolissacarídeo extraído dos grãos do kefir.



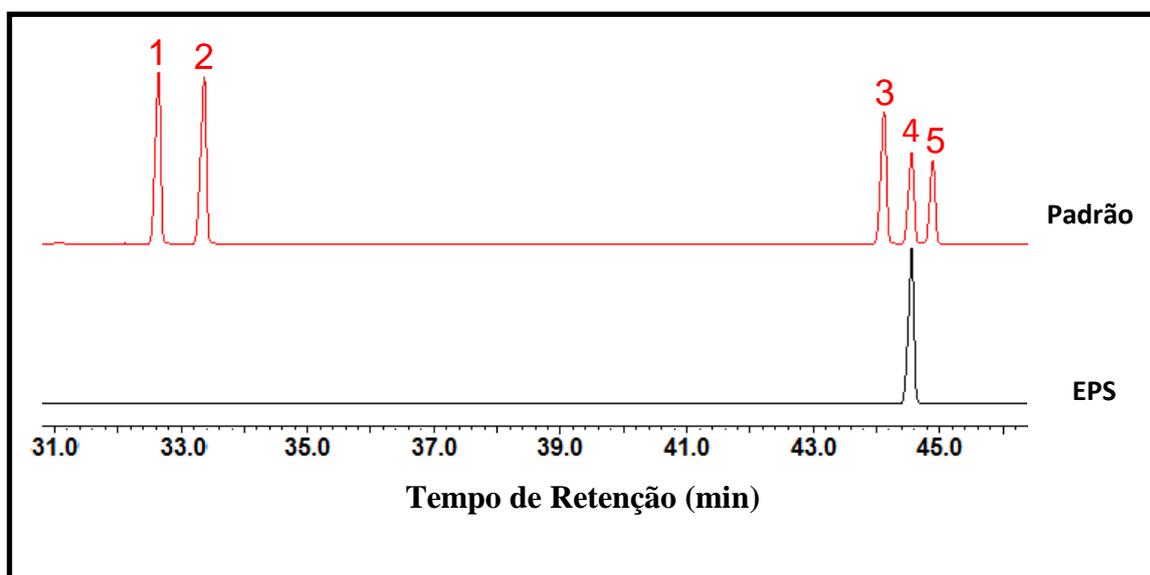
Fonte: O autor (2017)

No TG, observou-se cerca de 14,3% de perda de massa na faixa de temperatura de 30 a 255°C, atribuída a perda da água presente no EPS. A degradação do exopolissacarídeo inicia-se em torno de 255°C e continua rapidamente com o aumento da temperatura, apresentando perda de massa total de 71,43% até cerca de 400°C. Devido a lenta taxa de decomposição de resíduos, a perda de massa a partir de 400 até 900 é apenas cerca de 16,6%. Resultados semelhantes foram encontrados por Botelho et al. (2014). No DSC é observado um pico exotérmico em torno de 300°C atribuído a degradação do exopolissacarídeo, este comportamento deve-se a despolimerização do biomaterial.

5.3 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E ANÁLISE DA METILAÇÃO

A composição de monossacarídeo do EPS foi determinada com base na cromatografia de gás-líquido/espectrometria de massa, análise dos acetatos de alditol formados após hidrólise ácida, produzindo 100% (% peso/peso) de glicose (**FIGURA 15**).

FIGURA 15: Cromatogramas de gás de derivados de alditol de monossacarídeos padrão (1-ramnose, 2-arabnose, 3-manose, 4-glicose, 5-galactose) e exopolissacarídeo dos grãos de kefir hidrolisado (EPS).



Fonte: O autor (2017)

Esses resultados corroboram a análise de LC-ESI-MS de um EPS obtido a partir da fermentação de grãos de kefir em leite de soja, que era composto exclusivamente de resíduos de glicose (BOTELHO et al., 2014). Embora se tenha detectado apenas resíduos de glicose no EPS extraído da fermentação dos grãos de kefir em açúcar mascavo e água, sabe-se que o EPS mais estudado obtido a partir de grãos de kefir é formado principalmente por resíduos de glicose e galactose com uma relação molar relativa de 1,0: 1.1, conforme proposto por Mukai et al. (1988) para a kefirana. No entanto, já foi relatado em outros EPS obtidos a partir de grãos de kefir a presença de resíduos de manose, xilose e arabnose (JEONG et al., 2017; AHMED et al., 2013; WANG et al., 2010). Essa heterogeneidade do EPS extraído dos grãos de kefir pode ser atribuída a diferentes materiais alimentares utilizados no processo de fermentação (WANG; BI, 2008). Neste trabalho, foi utilizado o açúcar no meio de

fermentação dos grãos de kefir e isso poderia explicar o fato de serem encontrados apenas resíduos de glicose no EPS.

A substituição de radical livre da hidroxila por um metil é realizada na análise de metilação, onde são obtidos diferentes derivados de O-metil após hidrólise e acetilação. A metilação deste EPS, seguida de hidrólise ácida e acetilação dos alditóis, produz as unidades de derivativos mostradas na **Tabela 3**. A estrutura proposta para o polissacarídeo baseou-se em nossos dados experimentais (análise de metilação) e também na literatura (GHASEMLOU et al., 2012; MUKAI et al., 1988), conforme resumido na **FIGURA 16**.

Tabela 3. Os tempos de retenção e as proporções dos derivados metilados obtidos a partir do EPS após hidrólise ácida durante 4 h.

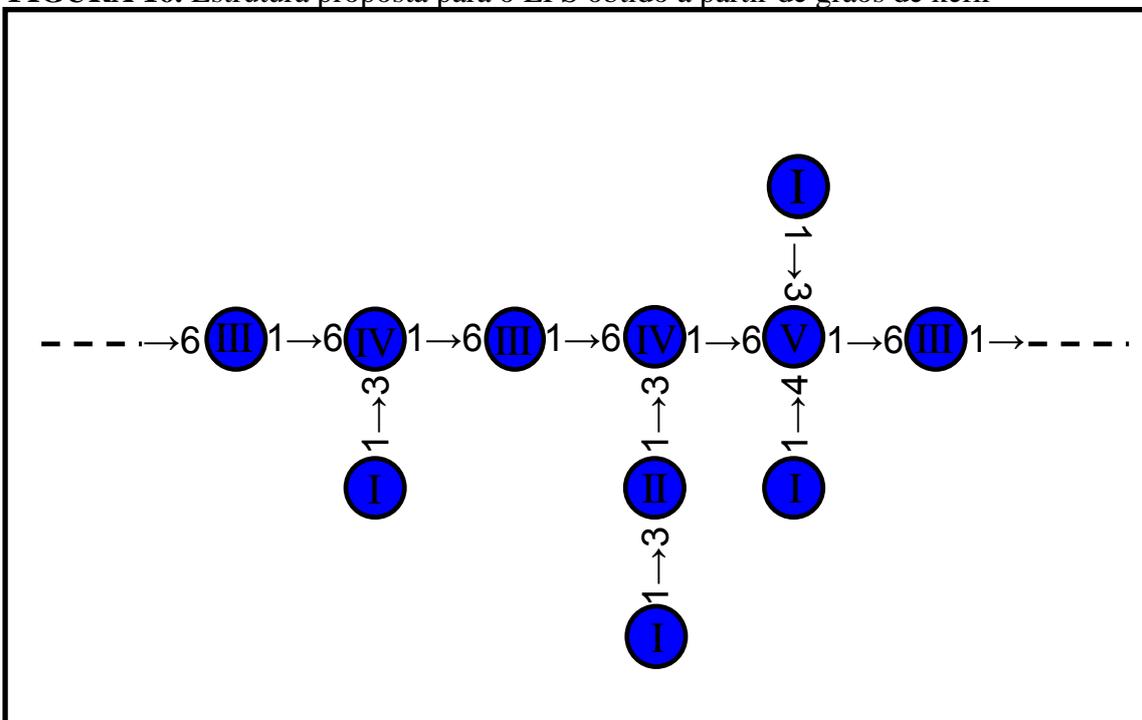
| Numero do pico | Tempo de Retenção (min) | Tempo de Retenção Relativo | Proporção (% do total) | Derivados de metila ^a | Unidades ^b |
|----------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| 1 | 28.26 | 1.00 | 11.42 | 2,3,4,6-tetra-Me-Glcp | I |
| 2 | 32.89 | 1.16 | 4.17 | 2,4,6-tri-Me-Glcp | II |
| 3 | 34.44 | 1.21 | 64.92 | 2,3,4-tri-Me-Glcp | III |
| 4 | 38.93 | 1.37 | 12.42 | 2,4-di-Me-Glcp | IV |
| 5 | 41.66 | 1.47 | 7.07 | 2-Me-Glcp | V |

Legenda: (a) O tipo de derivado de metil foi identificado pelo espectro da fragmentação típico; (b) Ver **FIGURA 16**. **Fonte:** O autor (2017).

Os tipos de unidades encontradas no EPS são mostrados na **Fig. 16** e confirmados na **Tabela 3**. Claramente, a preponderância dos derivados de 2,3,4-tri-O-metil e 2,4-di-O-metil da glicemia indica que a estrutura preponderante é composta por um núcleo central de 6 unidades ligadas (unidade III) com unidades racionais 3,6 substituídas (unidade IV) neste polímero de glicose. A presença de derivado de 2,3,4-tri-O-metil também foi observada em kefirana isolada a partir de grãos de kefir cultivados em soro de queijo, confirmando resíduos de glicose 6 ligados no esqueleto EPS (GHASEMLOU et al., 2012). Além disso, a glicose ocorre como derivado de 2,3,4,6-tetra-O-metil, indicando que esse resíduo é no terminal não redutor (unidade I). As menores proporções de resíduos de glicose ocorrem como derivados

de 2,4,6-tri-O-metil e 2-O-metil, o que significa que a estrutura também apresenta unidades de glicose com 3 ligações (unidade II) e unidades 3,4,6-substituídas (unidade V).

FIGURA 16. Estrutura proposta para o EPS obtido a partir de grãos de kefir

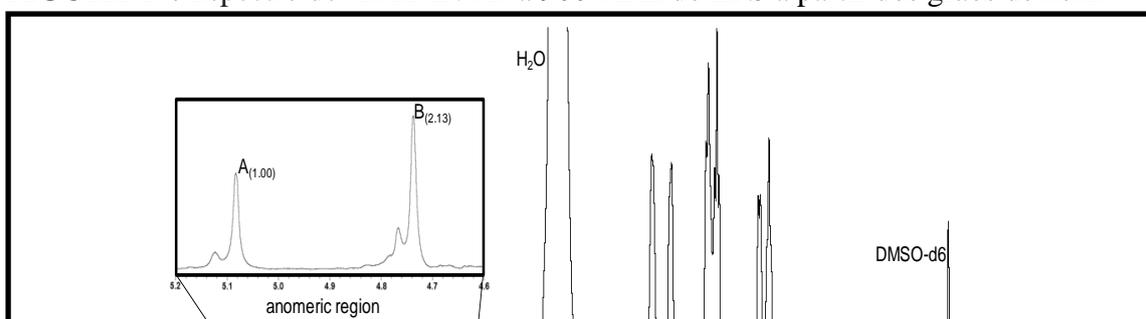


Fonte: O autor (2017).

5.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

A estrutura do EPS da fermentação de grãos de kefir em açúcar mascavo e água foi investigada usando espectros de RMN unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D). Devido à baixa solubilidade do EPS na água deuterada, foi necessário utilizar o DMSO-d₆ deuterado como solvente. O espectro de ¹H-RMN 1D (**FIGURA 17**) mostrou ainda dois sinais maiores na região anomérica: um a 5,07 ppm, atribuído às unidades de α-glicose e o sinal a 4,72 ppm, que corresponde aos resíduos de β-glicose. Na **FIGURA 17**, aproximadamente 20 mg de amostra foram dissolvidos em 0,5 mL de DMSO-d₆ a 99,9% e os espectros de ¹H RMN 1D foram registrados a 50°C. Deslocamentos químicos ¹H relativos ao ácido trimetilsililpropiónico externo a 0 ppm. Água residual suprimida por pré-saturação

FIGURA 17. Espectro de ¹H RMN 1D a 900 MHz do EPS a partir dos grãos de kefir



Região anomérica

 ^1H Deslocamento químico (ppm)**Fonte:** O autor (2017).

Os sinais encontrados na **FIGURA 17** designados como A (5,07 ppm) e B (4,72 ppm) referem-se aos prótons anoméricos de α -glicose e β -glicose, respectivamente. A região dos sinais de glicose anomérica foi destacada em maior ampliação para observar suas proporções em EPS (números integrais entre parênteses). A **Tabela 4** em seguida, possui mais informações sobre mudanças de ^1H -química de resíduos de α e β -glicose (A e B) de EPS.

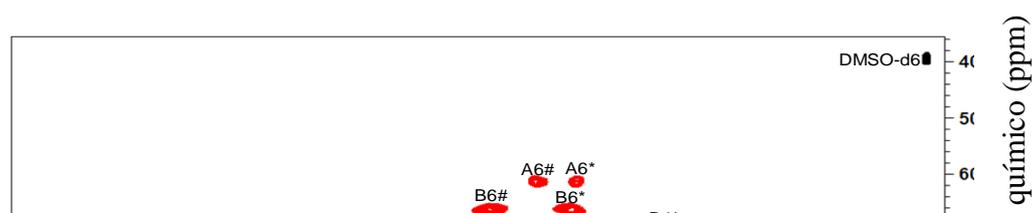
Tabela 4. Mudanças químicas de ^1H e ^{13}C das unidades fundadas no EPS obtidas a partir da fermentação de grãos de kefir cultivados em açúcar mascavo.

| Estrutura/ Deslocamento químico (ppm) | Unidade* | C1/H1 | C2/H2 | C3/H3 | C4/H4 | C5/H5 | C6/H6 |
|--|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| α -D-Glup | A | 99.85/ 5.07 | 70.39/ 3.17 | 74.09/ 3.48 | 70.71/ 3.42 | 72.64/ 3.76 | 61.26/ 3.51 |
| β -D-Glup | B | 98.40/ 4.72 | 72.16/ 3.30 | 74.09/ 3.48 | 70.39/ 3.26 | 70.71/ 3.68 | 66.27/ 3.52 |

Ver. **FIGURA 18.** Fonte: O Autor (2017)

O espectro ^{13}C - ^1H HSQC editado (**FIGURA 18**) nos permitiu distinguir os sinais anoméricos de α -glicose (99,85 e 5,07 ^{13}C / ^1H ppm, unidade A) e β -glicose (98,40 e 4,71 ^{13}C / ^1H ppm, unidade B), Que coincidem nos espectros de prótons.

FIGURA 18. 2D $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ editado HSQC a 900 MHz do EPS a partir da fermentação de grãos de kefir cultivados em açúcar mascavo



^1H Deslocamento químico (ppm)

Fonte: O autor (2017).

Os sinais de CH carbono/proton estão em preto (sinais de fase) e aqueles de CH_2 em vermelho (anti-fase). Os sinais designados como A referem-se aos α -D-Glucp e B aos resíduos β -D-Glucp. Os sinais atribuídos como C/H* e C/H# referem-se ao carbono em estado livre e limitado por ligação glicosídica, respectivamente. Os deslocamentos químicos foram exibidos em relação ao ácido trimetilsililpropiónico externo a 0ppm para ^1H e em relação ao metanol durante ^{13}C .

Os sinais de CH ocorrem na fase (picos positivos em preto), enquanto os de CH_2 ocorrem como anti-fase (picos negativos em vermelho). A presença de sinal de β -glicose no espectro de HSQC foi dez vezes maior do que os sinais de α -glicose, o que permitiu caracterizar este polímero contendo uma proporção de 1: 9 de resíduos de glicose α/β . Com este espectro foi permitido identificar os sinais de A6/H6 # (61,23/3,62 ppm) que foram atribuídos a resíduos ligados a α -glicose C6-glicose e aqueles de A6/H6 * (61,26/3,51 ppm) a resíduos α -glicose C6. Os sinais de B6/H6 # (66,22/3,76 ppm) e B6/H6* (66,27/3,52 ppm) foram atribuídos a resíduos de β -glicose ligados a C6 e livres, respectivamente

Todas as mudanças químicas detectadas no $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ do EPS são mostradas na **Tabela 4** e foram confirmadas na literatura (GONZAGA et al., 2013; GHASEMLOU et al., 2012; AIMANIANDA et al., 2009; KIM et al., 2000). O C3/H3# e o C4/H4# foram deslocados para baixo do campo em comparação com o estado livre C3/H3* e C4/H4 * e confirmam a presença das unidades de glicose 3-ligadas [\rightarrow 3] -p-D-Glucp- (1 \rightarrow) e as unidades 3,4,6-substituintes [\rightarrow 3,4,6] - β -D-Glucp- (1 \rightarrow), respectivamente, que foram detectadas por análise de metilação. Devido à heterogeneidade de ligações glicosídicas em A, a estrutura de EPS e a sobreposição de sinais, foi possível indicar apenas os dois resíduos principais a glicose α e β -anoméricos. O EPS relatado produzido por micro-organismos bacterianos são geralmente dextrana (3,6 ligados α -D-glucana), curdlana (3-ligados β -D-glucana) e celulose como os

polissacarídeos (4-ligado β -D-glucana). O esqueleto formado por 6-ligado α , β -D-glucana ramificado com as unidades 3,6-substituintes é raro, e foi detectado apenas nos componentes da parede de alguns fungos e nunca como EPS (SYNYTSYA; NOVAK, 2014).

Em conclusão, os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C mostrados na **Tabela 2** foram semelhantes aos relatados a uma α - β -D-glucana composta por uma coluna central, contendo principalmente 6 unidades de β -D-glucanas, parcialmente ramificadas na posição 3 (OLENNIKOV et al., 2012). O EPS também contém resíduos D-Glucp como unidades terminais não redutoras (unidade I). Além disso, os resíduos de D-Glucp ligado a 3 ligações e D-Glucp substituído com 3,4,6 são também encontrados como resíduos intermediados nos ramos (unidade II e V, respectivamente). Este polissacarídeo é diferente de todos os EPS produzidos por outros grãos de kefir reportados até o momento.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade realizados nas linhagens neoplásicas HEP-2, MCF-7 e K562, indicaram que o polissacarídeo apresentou potencial citotóxico alto (70%) para Leucemia mielocítica crônica (K-562), moderado (58%) para adenocarcinoma de mama humano (MCF- 7), enquanto que para o carcinoma de laringe humana (HEP-2) apresentou baixo efeito citotóxico (31%).

Linhagens de leiomioma e K-562 (leucemia mielóide crônica) resultam de mutação somática adquirida onde as células progenitoras hematopoiéticas bloqueiam a diferenciação e morte celular conferindo uma proliferação no crescimento celular, estas já foram testadas em grãos de kefir cultivados em leite e analisadas em citometria de fluxo e modelos animais (LEBLANC et al., 2007; TOLIOPOULOS et al., 2012).

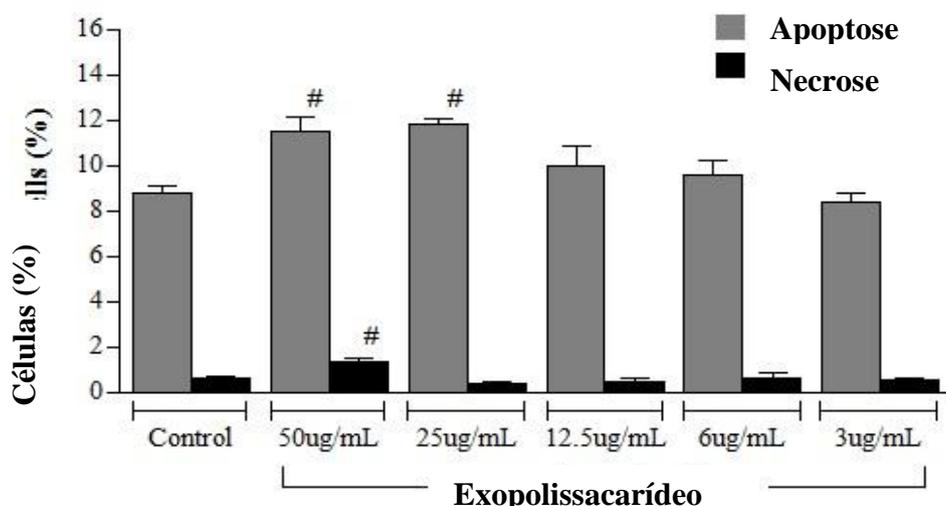
A bioatividade de polissacarídeos pode ser afetada e interagir com outros compostos químicos, massa molecular, estrutura e até o método de isolamento pode interferir na ação final. A atividade antitumoral de polissacarídeo por extração aquosa da planta *Camellia sinensis* pode atuar juntamente com o sistema imune, estimulando outras citocinas e células K-562 (WEI et al., 2011). A multirresistência é uma das principais causas na falha do tratamento do câncer, pois as células cancerosas já foram apresentadas uma grande variedade de fármacos. Os glicopolissacarídeos encontrados no cogumelo *Ganoderma lucidum* por meio do mecanismo de downregulation conseguiriam diminuir a expressão da multirresistência associada a proteínas nas células K562, com isso o polissacarídeo obtido do kefir pode apresentar um mecanismo similar (LI et al., 2008). Um exopolissacarídeo obtido da

espécie bacteriana *Pseudoaltermonas* sp., coletada na Antártica, foi capaz de inibir significativamente o crescimento de linhagens K-562, induzindo um colapso na membrana mitocondrial e ativação da caspase-9, induzindo apoptose. Este resultado denota que poder existir uma associação existente da cultura do kefir com uma gama de micro-organismos que individualmente podem promover a inibição de vários tipos de tumores (CHEN et al.,2015b).

5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE COM LINFÓCITOS (NECROSE E APOPTOSE)

O presente trabalho avaliou a ação do EPS e sua eficiência contra algumas linhagens tumorais, contudo quando testados em linhagens de células primárias (linfócitos) apresentaram valores próximos à média em concentrações superiores a 12,5µg/ml demonstrando ação apoptótica (**FIGURA 19**).

FIGURA 19: Efeitos da viabilidade celular de linfócitos humanos tratados com o exopolissacarídeo em diferentes concentrações.

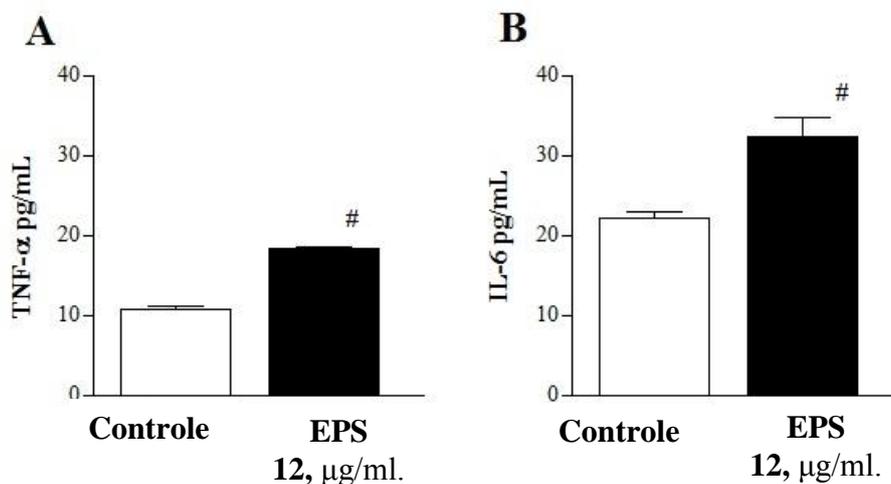


Fonte: O autor (2017)

Segundo a **FIGURA 19**, a dosagem de segurança utilizada com o politolal é inferior a 25 µg/ml. Os valores apoptóticos e necróticos encontrados para as células tratadas com o exopolissacarídeo foram semelhantes às células de controle (células + meio) em 12, 5, 6 e 3 µg/ml. As barras horizontais representam a média de seis experiências independentes realizadas em duplicata. # P = 0,03

A influência direta de citocinas antiinflamatórias (IL-4 e IL-10) e de uma série de pró-inflamatórias (IL-2, IL-6, IFN-γ e TNF-α) em linfócitos foi demonstrada, e apenas foi presenciado um aumento acentuado de TNF-α e IL-6 (**FIGURA 20**).

FIGURA 20: Perfil da produção de TNF- α e IL-6 promovida pelo exopolissacarídeo em culturas de linfócitos humanos em 24 horas de ensaio



Legenda: A - O exopolissacarídeo foi capaz de induzir a produção mais elevada de TNF- α em relação às células de controle. B - Valores significativos da produção de IL-6 também foram observados em culturas tratadas com o exopolissacarídeo. As barras horizontais representam a média de seis experiências independentes realizadas em duplicata. **Fonte:** O autor (2017).

Diante da ação de um patógeno ou mesmo de um indutor de inflamação, existem vários mediadores inflamatórios, que provém do plasma e são secretados por várias células de defesa. Estes compostos são produzidos por macrófagos, mastócitos e por células presentes em um tecido local (QUINDERÉ, 2011). Eles apresentam ação pró-inflamatória (Th1) com as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e FNT (Fator de necrose tumoral) ou anti-inflamatória (Th2) com as interleucinas (IL) 4, 10, 13 e FTC β (fator transformador de crescimento β) (OLIVEIRA et al., 2011; PAIVA, 2013). A análise de nitrito permaneceu não foi alterada durante o teste.

Os polissacarídeos são usados de diversas formas, seja como adjuvantes ou estimuladores do sistema imunológico e se tornam cada vez mais complexos quando combinados a vários lipídios, peptídios ou a outros grupos polares (CHABOT et al., 2001). O exopolissacarídeo obtido a partir dos grãos de kefir mostrou exercer atividade imunomoduladora com a estimulação de TNF- α e IL-6. Alguns imunomoduladores apresentam propriedades bem características que são influenciados pela estereoquímica do composto, seja no tamanho molecular, ou no número de resíduos de açúcar (CHABOT et al., 2001). A administração da kefirana, segundo Kwon et al., (2008), inibiu significativamente

eosinófilos, e citocinas como IL-4 e IL-5 continuaram a níveis normais depois da administração do EPS em animais, concordando com os resultados obtidos neste trabalho. Foi demonstrado que o kefir modula a resposta imune de camundongos aumentando os níveis de IgA em células intestinais na mucosa brônquica, e que frações isoladas do kefir induzem a produção de citocinas TNF- α e IL-6 (VINDEROLA et al., 2006). Análises *in vivo* demonstraram que o kefir exerce um papel de adjuvante sobre o sistema da mucosa, aumentando os níveis de IgG e IgA, contudo o mecanismo de ação ainda não foi devidamente esclarecido (FANWORTH, 2005). A citocina IL-6 é produzida por diversos tipos celulares, cujas células T são as principais fontes. Elas influenciam respostas imunes, sendo uma das principais mediadoras na fase aguda da inflamação, enquanto que a principal atividade biológica do TNF- α é ser o mediador em neoplasias malignas (VARELLA; FORTE, 2014).

O leite fermentado do kefir, em modelos animais, consegue atuar contra parasitas como a *Giardia lamblia* aumentando a resposta das células T CD4⁺, sendo os responsáveis em secretar as citocinas e promover o crescimento e diferenciação das células B (FRANCO et al., 2013). Diante do exposto, é necessário testar o EPS extraído com modelos de organismos vivos, visto que o comportamento do exopolissacarídeo pode induzir a atividade de algumas linhagens imunes celulares frente a outras.

Já foi demonstrado que exopolissacarídeos de micro-organismos como os da bactéria *Panibacillus polymyxa* aumentou significativamente a porcentagem de células T citotóxicas em sangue de rato, mas não houve alteração de linfócitos B, demonstrando que os EPS abordados influenciam certas linhagens *in vivo* (CHANG et al., 2010). Bleau et al., (2010) perceberam que exopolissacarídeos extraídos de lactobacilos diminuíram a atividade metabólica de linfócitos.

O suplemento de uma alimentação de frangos com uma β -glucana em 6 semanas demonstraram que este exopolissacarídeo não influenciou no ganho de peso dos animais e não elevou a quantidade de linfócitos no sangue, contudo houve um aumento da quimiotaxia de macrófagos ao elevar seu suplemento em uma ordem de 0,025% na ração (CHENG et al., 2004). Em concordância com Vinderola et al., (2006), é proposto que várias substâncias geradas pelo consórcio microbiano podem ser capazes de estimular células imunes. Visando isto, poucos trabalhos analisam a atividade do exopolissacarídeo do consórcio microbiano e sim de micro-organismos fermentadores já isolados do kefir (MONTIJO-PRIETO, et al., 2015; GHONEUM, et al., 2015).

6 CONCLUSÃO

Seguindo a metodologia de extração do polissacarídeo do kefir cultivado em açúcar mascavo, foi possível obter o EPS a parte de extração alcalina. E os testes químicos (molisch, fenol-sulfúrico, Bradford). Indicaram que o EPS isolado não apresentara contaminações.

Na espectroscopia em infravermelho (FTIR-ATR) foi possível observar máximos característicos de polissacarídeos pelo infravermelho, enquanto que no DSC e TG encontrou-se uma taxa de degradação alta semelhante a outros polissacarídeos.

Estruturalmente foi descoberto um novo EPS que contém ligações α/β em proporção 9:1; este composto é formado exclusivamente de resíduos de glicose. Neste foi confirmada a presença das unidades de glicose 3-ligadas [$\rightarrow 3$] -p-D-Glucp- (1 \rightarrow] e as unidades 3,4,6-substituintes [$\rightarrow 3,4,6$] - β -D-Glucp- (1 \rightarrow]. Este composto é característico de um polissacarídeo β -D-glicêmico composto por 6 unidades, parcialmente ramificado na posição 3 e apresenta unidades terminais não redutoras. Além disso, os resíduos de D-Glucp ligado a 3 ligações e D-Glucp substituído por 3,4,6 são também encontrados como resíduos intermediados nos ramos. Essas características são típicas de homopolissacarídeos e glucanas, confirmados por RMN e HSQC. Apresentando assim um EPS nunca estudado na literatura

O teste de citotoxicidade indica que o polissacarídeo do kefir apresenta um potencial farmacológico para a leucemia mielóide crônica com citotoxicidade elevada em 70% (linhagem K-562) e que ainda pode ser testado pra outros tipos de cânceres.

O EPS induziu a formação de TNF- α e IL-6 indicando que é um pró-inflamatório, e a capacidade deles não apresentarem, em concentrações baixas, prejuízo a células sanguíneas, promovem ser um excelente fármaco.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 251-282 p.

ADEODATO, M. G.; SILVA, M. A.; SANTOS, L. O.; BEPPU, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: a review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254-263, mar. 2011.

AHMED, Z.; WANG, Y.; ANJUM, N.; AHMAD, H.; AHMAD, A.; RAZA, M.
Characterization of new exopolysaccharides produced by coculturing of *L. kefiranofaciens* with yoghurt strains. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 377-383, ago. 2013.

AIMANIANDA, V.; CLAVAUD, C.; SIMENEL, C.; FONTAINE, T.; DELEPIERRE, M.; LATGÉ, J.-P. Cell Wall β -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae* structural characterization and in situ synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 13401–13412, maio 2009.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; VEIGA, A. B. G.
Biologia Molecular da Célula. 4^a Edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALEXANDRE, Samara Marrye Aaguilar. **Polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto *Rhizoctonia solani*: extração, purificação e atividade biológica**. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós graduação em Química, São José do Rio Preto, 2015.

ALI, Syed Haris. **The world of b-glucan - a review of biological roles, applications and potential areas of research**. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Institute of Medical Biology, Faculty of Medicine University of Tromso, Norway, 2009.

ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. **Cultivo celular - Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Disponível em: http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/capitulo_5_vol2.pdf>. Acesso em: 30 de abril 2017.

AMORIM, Aline Rodrigues. **Genética do câncer**. 42 f. Monografia – Licenciatura em Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília, 2002.

ANDREANI, Larissa. **Propriedades Térmicas, Mecânicas e Estabilidade de Filmes de Pectina Cítrica e Poli (4-estireno sulfonato de sódio)**. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

ANGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 263–267, 1993.

ANISIMOVA, N. Y.; USTYUZHANINA, N. E.; DONENKO, F. V.; BILAN, M. I.; USHAKOVA, N. A.; USOV, A. I.; NIFANTIEV, N. E.; KISELEVSKIY, M. V. Influence of Fucoidans and Their Derivatives on Antitumor and Phagocytic Activity of Human Blood Leucocytes. **Biochemistry (Moscow)**, v. 80, p. 925-933, 2015.

AROSA, Fernando A.; CARDOSO, Elsa M.; PACHECO Francisco C. **Fundamentos de Imunologia**. 2. ed. Lisboa: LIDEL – Edições Técnicas, 2012, p. 565.

BARROS, A. C. S. D.; BARBOSA, E. M.; GEBRIM, L. H.; ANELI, A.; FIGUEIRA, F. A.; DEL GIGLIO, A.; GUSMÃO, C. B.; PELIZON, C.; MARTELLA, E.; MOTTA, E.; FERNANDES, J. L.; PINOTTI, J. A.; RIBEIRO L. C. B.; SANTOS, M. O.; ARAUJO, M. B.; ABREU E LIMA, M. C.; MOURÃO NETO, M.; YAMAGUCHI, N. H.; CARMO, P. A. O.; MARQUES, R. Diagnóstico e Tratamento do Cancer de Mama. **Projeto Diretrizes**, p. 2-15, 2001.

BENTLEY, S. D.; AANENSEN, D. M.; MAVROIDI, A.; SAUNDERS, D.; RABBINOWITSCH, E.; COLLINS, M.; DONOHOE, K.; HARRIS, D.; MUPHY, L.; QUAIL, M. A.; SAMUEL, G.; SKOVSTED, I. C.; KALTOFT, M. S.; BARRELL, B.; REEVES, P. R.; PARKHILL, J.; SPRATT, B. G. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. **PLOS Genetics**, v. 2, p. 31, 2006.

BERNE, R. M.; GENUTH, S. M. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 190, 2000.

BÍBLIA, A. T. Salmos. In BÍBLIA. Português. **Sagrada Bíblia**. Antigo e Novo Testamentos. Tradução de João Ferreira de Almeida (Revisada e Corrigida). Barueri-SP: Sociedade Bíblica do Brasil, 2013. p. 406.

BLEAU, C.; MONGES, A.; RASHIDAN, K.; LAVERDURE, J. P.; LACROIX, M.; CALSTEREN, M. R. V.; MILLETTE, M.; SAVARD, R.; LAMONTAGNE, L. Intermediate

chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 666–675, 2010.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1-3)- β -D-Glucans as biological response modified review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate. Polymers**, v. 28, p.3-14, 1995.

BOLLA, P. A.; CARASI, P.; SERRADEL, M. DE LOS A.; DE ANTONI, G. L. Kefir-isolated *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhibits the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* in vitro. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 96–102, 2013.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Goma Xantana: Características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 171-188, jul./dez. 2008.

BOTELHO, P. S.; MACIEL, M. I. S.; BUENO, L. A. MARQUES, M. F. F.; MARQUES, D. N.; SILVA, T. M. S. Characterization of a new exopolysaccharide obtained from of fermented kefir grains in soymilk. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p. 1-6, 2014.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the qualification of microgram quantities of protein utilize the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.7, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.46, 23 de Outubro de 2007. **Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Diário Oficial, Brasília, seção 1, p. 5, 24 de Outubro 2007.

CHABOT, S.; YU, H.; LESELEUC, D. L.; CLOUTIER, D.; CALSTEREN, M. V.; LESSARD, M.; ROY, D.; LACROIX, M.; OTH, D. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. **Le Lait**, v. 81, p. 683-697, 2001.

CALDER, P.C. N-3 Polyunsaturated fatty acids and mononuclear phagocyte function. **Medicinal Fatty Acids in Inflammation**. Edited by J. Kremer, 1998.

CARVALHO, G. B. DE; MANNARINI, L.; KOWALSKI, L. P. Neoplasia localmente avançada de laringe na era da preservação de órgão: qual a melhor estratégia terapêutica? **Revista Onco&**, v. 4, p. 28-34, 2011.

CHANG Z. Q.; REZA, M. A.; LEE, J. S.; GEBRU, E.; JANG, S.; CHOI, M.; LEE, S.; DAMTE, D.; KIM, J.; PARK, S. Immunomodulatory activities and subacute toxicity of a novel beta-glucan from *Paenibacillus polymyxa* JB115 in rats. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, p. 124-134, 2010.

CHENG, Y.; D. LEE; C. WEN; C. WENG. Effects of dietary supplementation on lymphocyte proliferation, macrophage chemotaxis and specific immune response in broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 17, p. 1145–1149, 2004.

CHEN, Z.; SHI, J.; YANG, X.; NAN, B.; LIU, Y.; WANG, Z. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. **International Dairy Journal**, v. 43, p. 15-21, 2015a.

CHEN, G.; QIANA, W.; LIA, J.; XUA, Y.; CHEN, K. Exopolysaccharide of Antarctic bacterium *Pseudoaltermonas* sp. S-5 6 induces apoptosis in K562 cells, **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 107-114, 2015b.

CHO, J. H.; KIM, T.; YUN, H. Y.; KIM, H. H. Facile depolymerization process of β -glucan through the use of a high pressure homogenizer. **American Journal of Research Communication**, v. 2, n. 4, p. 168-178, 2014.

CIUCANU, J.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v.131, p. 209–217, 1984.

COCCO, M. T., CONGIU, C., LILLIU, V., & ONNIS, V. Synthesis and *in vitro* antitumoral activity of new hydrazine pyrimidine-5-carbonitrile derivates. **Bioorganics Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 366-372, 2006.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 6, p. 799–806, 2007.

DABA, A. S.; EZERONYE, O. U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 672-678, December 2003.

DEDIVITIS, R. A.; TINCANI, A. J.; CERNEA, C. R.; MONTENEGRO, F. L. M.; TEIXEIRA, G. V.; KOWALSKI, L.P.; CERVANTES, O.; ARAUJO, P.P. C.; ARAP, S. S.; CHONE, C. T.; GEBRIM, E. M. M. S.; LIMA, E. M.; ALTEMANI, A.; ANDRADA, N. C. Cancer de Laringe: Tratamento. **Projeto Diretrizes**, p. 3-14, 2011.

DELLAVANCE, A.; ANDRADE, L. E. C. Das células LE às células HEp-2: perspectiva histórica e avaliação crítica do teste de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos antinúcleo. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 69, n.1/ 2, p. 07-21, 2012.

DIAS, P. A.; ROSA, J. V.; TEJADA, T. S.; TIMM, C. D. Propriedades antimicrobianas do kefir. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-5, 2016.

DING, A. H., NATHAN, C. F., & STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, v. 141, p. 2407–2412, 1988.

DUARTE, Nathália Lopez. **A Leucemia Mielóide Crônica e o uso do mesilato de imatinibe em seu tratamento**. 73 f. Monografia - Curso Técnico de nível médio em Laboratório em Biodiagnóstico em Saúde, Fundação Oswaldo cruz - Rio de Janeiro, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, 50-356, 1956.

EICEMAN, G. A. Instrumentation of Gas Chromatography. Edited by Robert A. Meyers. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ESNAASHARI, S. S., REZAEI, S., MIRZAEI, E., AFSHARI, H., REZAYAT, S. M., & FARIDI-MAJIDI R. (2014). Preparation and characterization of kefir electrospun nanofibers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 50–56, 2014.

FARNWORTH, E. R. Kefir - a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 2, p. 1-17, 2005.

FERRI, Anne Letícia Silva. **Desenvolvimento de meio quimicamente definido para a produção de polissacarídeo capsular em cultivo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14**. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, 2013.

FIorentini, A. M.; BALLUS, C. A.; OLIVEIRA, M. L.; CUNHA, M. F.; KLAJN, V. M. The influence of different combinations of probiotic bacteria and fermentation temperatures on the microbiological and physicochemical characteristics of fermented lactic beverages containing soybean hydrosoluble extract during refrigerated storage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 597-607, 2011.

Fontán, M. C. G.; MARTÍNEZ, S.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 762-767, 2006.

FRANCO, M. C.; GOLOWCZYC, M. A.; ANTONI, G. L. DE; PÉREZ, P. F.; HUMEN, M.; SERRADELL, M. A. Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1815-1822, 2013.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; PAIS, J.; COSTA N.; OLIVEIRA, C.; MAFRA, L.; HILLIOU, L.; OLIVEIRA, R. E.; REIS, M. A. M. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 859–865, 2009.

GADÊLHA, Morgana Maria Souza. **Encapsulação do polissacarídeo proveniente de *Anacrdium occidentale* em lipossomas e aplicação Biológica**. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2001.

GAO, C. Potential application of welan gum in upstream petroleum industry. **International Journal of Oil, Gas, and Coal Engineering**, v. 4, n. 2, p. 16-23, 2016.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

GHASEMLOU, M.; KHODAIYAN, F.; JAHANBIN, K.; MOHAMMAD, GHARIBZAHEDI, S. M. T.; TAHERI, S. Structural investigation and response surface optimization for improvement of kefir production yield from a low-cost culture medium. **Food Chemistry**, v. 133, p. 383-389, 2012.

GHONEUM, M.; FELO, N.; AGRAWAL, S.; AGRAWAL, A. A novel kefir product (PFT) activates dendritic cells to induce CD4+T and CD8+T cell responses *in vitro*. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, p. 1-9, 2015.

GONZAGA, M. L. C.; MENEZES, T. M. F.; SOUZA, J. R. R.; RICARDO, N. M. P. S.; SOARES, S.A. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. **Bioactive Carbohydrate and Dietary Fibre**, v.2, p. 152-156, 2013.

GUL, O.; MORTAS, M.; ATALAR, I.; DERVISOGLU, M.; KAHYA OGLU, T. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1517-1525, 2015.

GÜVEN, A.; GÜVEN, A.; GÜLMEZ, M. The effect of Kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. **Journal of veterinary medicine**, v. 50, n. 8, p. 412-416, 2003.

GUZEL-SEYDIM, Z.; WYFFELS, J. T.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 25-29, 2005.

HAMERSCHLAK, N. As leucemias no Brasil. **Revista Onco&**, v. 11, p. 20-23, 2012.

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 86-94, 2000.

HESENKAS, H.; DINKÇI, N.; SEÇKIN, K.; KINIK, O.; GONÇ, S. Antioxidant Properties of Kefir Produced from Different Cow and Soy Milk Mixtures. **Journal of agricultural sciences**, v. 17, p. 253- 259, 2011.

INCA, Condutas do INCA - Câncer de Mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 1, p. 9-19, 2001.

INCA, Condutas do INCA - Leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n.1, p. 5-8, 2003.

INCA. **Estimativa/2016 – Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em: 26 Jul. 2017.

IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F. C. Microbiology, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, n. 21, p. 613-620, 2005.

JEONG, D.; KIM, D.; KANG, II-B.; KIM, H.; SONG, K.; KIM, H.; SEO, K. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. **Food Control**, v. 78, p. 436-442, 2017.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical Structures and Bioactivities of sulfated polysaccharides from Marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, p. 196-223, 2011.

JIMÉNEZ, N. I. V.; NIELSEN, M. E.; LINDENSTROM, T. Beta-Glucan induced immune modulation of wound healing in common carp (*Cyprinus carpio*). **DTU Food**, p.128, 2012.

KASSAKUL, W.; PRAZNIK, W.; VIERNSTEIN H.; HONGWISSET D.; PHRUTIVORAPONGKUL A.; LEELAPORNPIPID P. Characterization of the mucilages extracted from *Hibiscus rosa-sinensis* Linn and *Hibiscus mutabilis* Linn and their skin moisturizing effect. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 453-457, 2014.

KIM, Y.-T.; KIM, E.-H.; CHEONG, C.; WILLIAMS, D. L.; KIM, C.-W.; LIM S.-T. Structural characterization of β -D-(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 331–341, 2000.

KIRCHER, H. W. Gas–liquid chromatography of methylated sugars. **Analyses Chemical**, v. 32, p. 1103–1106, 1960.

KOOIMAN, P. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. **Carbohydrate Research**, v. 7, p. 200-211, 1968.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 3–11, 2008.

KWON, O.; AHN, K.; LEE, M.; KIM, S., PARK; B., KIM, M.; LEE, I.; OH, S.; LEE, H. Inhibitory Effect of Kefiran on Ovalbumin-induced Lung Inflammation in a Murine Model of Asthma. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 1590-1596, 2008.

LAUDARES, Sarita Soraia de Alcântara; SANTOS, Mariana Rabelo Rios Martins; DIAS, Francesca Silva; SCHWAN, Rosane Freitas. **Produção de exopolissacarídeo por bactérias do ácido láctico**. Reunião Regional da SBPC em Lavras, Minas Gerais, 2010.

LEAL, Ana Paula Fernandes. **Aplicação do método de ressonância magnética nuclear para identificação e quantificação de polissacarídeos meningocócicos sorogrupos C e**

W135. 144 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2013.

LEBLANC, A. M.; MATAR, C.; FARWORTH E.; PERDIGON, G., Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer, **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1920–1928, 2007.

LEE, A. V.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N. E. MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, 2015.

LEHNINGER, Albert L. **Princípios de bioquímica**. 7.ed. São Paulo: Sarvier, p.725, 1991.

LEITE, Joana Gonçalves. **Aplicação das técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à preservação do Patrimônio**. Faculdade Engenharia da Universidade do Porto, 2008.

LI, W.; ZHANG, B.; WEI, R.; LIU, J.; LIN, Z. Reversal effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on multidrug resistance in K562/ADM cell line, **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, p. 620–627, 2008.

LI, L.; WIEME, A.; SPITAEELS, F.; BALZARINI, T.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VUYST, L.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P. *Acetobacter sicerae* sp. nov., isolated from cider and kefir, and identification of species of the genus *Acetobacter* by dnaK, groEL and rpoB sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2407-2415, 2014.

LIN, C. W.; CHEN, H. L.; LIU, J. R. Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, p. 14-18, 1999.

LIU, J.; CHEN, M.; LIN, C. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2467-2474, 2005.

LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, p. 67–74, 2006.

LOZIO, C. B.; LOZIO, B. B. Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line with Positive Philadelphia Chromosome. **Blood**, v. 45, n.3, 1975.

LUNA, William Norbey Sánchez. **Acetilação do exopolissacarídeo (1→6)-β-D-Glucana (Lasiodiplodana): Derivatização química e caracterização**. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica do Paraná, 2016.

LUZYANIN, K.; ABRANTES, M. Ressonância magnética nuclear - Ferramenta versátil em Química farmacêutica e Imagiologia Médica. **Química**, 117, p. 25-30, 2010.

MAEDA, H.; ZHU, X.; OMURA, S. S.; KITAMURA, S. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. **Biofactors**, v. 22. P. 197-200, 2004a.

MAEDA, H.; ZHU, X.; OMURA, K.; SUZUKI, S.; KITAMURA, S. Structural Characterization and Biological Activities of an Exopolysaccharide Kefiran Produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5533-5538, 2004b.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1-16, 2013.

MANO, Eloisa Biasotto; MENDES, Luís Cláudio. **A natureza e os polímeros**. Meio ambiente, geopolímeros, fitopolímeros e zoopolímeros. 1 ed. São Paulo: Blucher, p. 403-412, 2011.

MARSHALL, M. V.; COLE, W. M.; BROOKER, B. E. Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 57, p. 491–497, 1984.

MARGARITIS, A.; PACE, G. W. **Microbial polysaccharides**. In: M. Moo-Young. *Comprehensive Biotechnology*. Canada: University of Waterloo, p.1005-1044, 1985.

MASSARO, Daniel Luís. **Perspectivas para a avaliação qualitativa de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em sedimentos do Manguezal do Itacorubi através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Próton**. Relatório de estágio. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas- CFM, Departamento de Química, 2005.

MATSUU, M.; SHICHIJO, K.; OKAICHI, K.; WEN, C. Y.; FUKUDA, E.; NAKASHIMA, M.; NAKAYAMA, T.; SHIRAHATA, S.; TOKUMARU, S.; SEKINE, I. The protective effect of fermented milk kefir on radiation-induced apoptosis in colonic crypt cells of rats. **Journal of Radiation Research**, v. 44, n. 2, p.111-115, 2003.

MEERS, P.; MEALY, T. Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan. **Biochemistry**, v.33, n.19, p. 5829–37, 1994.

MELO, Francisco de Assis Dutra. **Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeos extracelulares por *Zoogloea sp* em melão de cana-de-açúcar**. 117 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

MIGUEL, M. G. C. P.; CARDOSO, P.G.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1875–188, 2011.

MONTIJO-PRIETO, S. DE; MORENO, E.; BERGILLOS-MECA, T.; LASSERROT, A.; RUIZ-LÓPEZ, M.; RUIZ-BRAVO, A.; JIMÉNEZ-VALERA, M. A *Lactobacillus plantarum* strain isolated from kefir protects against intestinal infection with *Yersinia enterocolitica* O9 and modulates immunity in mice. **Research in Microbiology**, v. 166 p. 626-632, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS. **Sistema de Informações de Mortalidade (SIM).**

Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 06 Jul. 2017.

MOREIRA, M. E. C.; SANTOS, M. H.; PEREIRA, I. O.; FERRAZ, V.; BARBOSA, L. C. A.; SCHNEEDORF, J. M. Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir, **Química Nova**, v.31, p. 1738-1742, 2008.

MORRIS, E. R.; NISHINARI, K.; RINAUDO, M. Gelation of gellan - a review. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 373-411, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1993.

MOSADDEGH, M.; GHARANJIK, B. M.; NAGHIBI, F.; ESMAEILI, S.; PIRANI, A.; ESLAMI TEHRANI, B.; KERAMATIAN, B.; HASSANPOUR, A. A survey of cytotoxic effects of some marine algae in the Chabahar coast of Oman Sea. **Research Journal of Pharmacognosy**, v.1, p. 27-31, 2014.

MUKAI, T., TOBA T., ITOH, T., & ADACHI, S. Structural microheterogeneity of kefiran from kefir grains. **Japanese Journal of Zootechnical Science**, v. 59, p. 167–176, 1988.

NAKAO, Y.; KONNO, A.; TAGUCHI, T.; TAWADA, T.; KASAI, H.; TODA, J.; TERASAKI, M. Curdlan: properties and application to foods. **Journal of Food Science**, v. 56, n.3 1991.

NALWOGA, Hawa. **Molecular markers in breast carcinoma.** A study with focus on molecular phenotypes, angiogenesis and stem cells in an African population. 140 f. Dissertation for the degree philosophiae doctor (PhD) - The gade Institute, Section for Pathology, 2010.

NELSON, David. L.; COX, Michael. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 235-270, 2011.

NGUYEN, D. T.; NGUYEN, T. H. Detection on Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Exopolysaccharides Isolated in Plant-Originated *Lactococcus lactis*. **Biomedical & Pharmacology Journal**, v. 7, n. 1, p. 33-38, 2014.

NINANE, V.; MUKANDAYAMBAJE, E.; BERBEN, G. Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing 16S rDNA variable regions. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 1111–1117, 2017.

OLENNIKOV, D. N.; AGAFONOVA, S. V.; ROKHIN, A. V.; PENZINA, T. A.; BOROVSKII, G. B. Branched Glucan from the Fruiting Bodies of *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr) Karst. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, p. 65–70, 2012.

OLIVEIRA, C. M. B DE, SAKATA, R. K.; TSA, ISSY, A. M. GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n.2, p. 255-265, 2011.

ÖNER, Ebru Toksoy. **Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass** - Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries. Istanbul: Springer; p. 35–56, 2013.

PAIVA, Igor Moura de. **Caracterização estrutural e avaliação da capacidade imunomodulatória de exopolissacarídeos produzidos por lactobacilos isolados de kefir**. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Biologia Geral, Universidade de Minas Gerais, 2013.

PAIVA, I. M.; STEIBERG, R. S.; LULA, I. S.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; MENDES, T. O.; BELL, M. J. V.; NICOLI J. R.; NUNES, A. C.; NEUMANN, E. *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food applications. **Food Science and Technology**, v. 72, p. 390-398, 2016.

PALMERO, E. I. Hereditariedade e câncer de mama. **Revista Onco&**, v. 9, p. 38-41, 2013.

PEREIRA, T. M. M. **Caracterização térmica (TG/DTG, DTA, DSC, DSC-fotovisual) de hormônios bioidênticos (estriol e estradiol)**. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013.

QUINDERÉ, Ana Luíza Gomes. **Propriedades na nocicepção e na inflamação de uma fração polissacarídica sulfatada de alga marinha *Acanthophora muscoides***. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, 2011.

RIBEIRO, C. V.; VASCONCELOS, A. C.; FILHO, J. S. A. Apoptosis and expression of argyrophilic nucleolus organizer regions in epithelial neoplasms of the larynx. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 81, n. 2, p. 158-166, 2015.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobiol Agents**, v. 25, p. 404-408, 2005.

RODRIGUES, J. A. G.; FARIAS, W. R. L. Avaliação comparativa dos polissacarídeos sulfatados extraídos de rodofíceas *Halymenia spp.*: Ferramenta taxonômica para algas? **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, n. 1, 2009.

ROSS, G. D.; VETVICKA, V.; YAN, J.; XIA, Y.; VETVICKOVA, J. Therapeutic intervention with complement and Beta-glucan in cancer. **Immunopharmacology**, v. 42, p. 61 – 74, 1999.

RUSCHEL, C. F. C.; HUANG, C. T.; SAMIOS, D.; FERRÃO, M. F. Análise exploratória aplicada a espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) de blendas de biodiesel/diesel. **Química Nova**, v. 37 n.5, 2014.

SHI, L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 37–48, 2016.

SCHMID, J.; SIEBER, V.; REHM, B. Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 496, 2015.

SHIOMI, M.; SASAKI, K.; MUROFUSHI, M.; AIBARA, K. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain, **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 35, p. 75- 80,1982.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, p. 7–30, 2016.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. I.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 85-92, 2006.

SILVA, Thâmara Machado e. **Caracterização de polissacarídeo extraído de cajueiro (*Anacardium occidentale, L.*) e sua aplicação para imobilização de Horseradish peroxidase (HRP)**. 78 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, 2007.

SILVA, Juliana Maria Costa da. **Caracterização parcial e atividades farmacológicas do extrato rico em polissacarídeos sulfatados da angiosperma marinha *Halodule wrightii***. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2008.

SIMOVA, E., BESHKOVA, D., ANGELOV, A., HRISTOZOVA, T., FRENGOVA, G., SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1–6, 2002.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER F.J.; CROUCH, S.R., **Fundamentos de Química Analítica**, 8 ed. São Paulo: Norte-Americana, Thomson Learning, 2006.

SOMENSI, Francini Yumi Kagimura. **Bioprodução de β -(1-6)-D-glucana e obtenção de derivado de por carboximetilação visando atividade biológica**. 101 f. Dissertação

(Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica do Paraná, 2014.

SOUZA, R. M. ATR: Avanço da espectroscopia de infravermelho na análise de materiais plásticos. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v. 21, n. 3, 2009.

SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of Translational Medicine**, v. 2, p. 17, 2014.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 339-364, 2004.

TAKIZAWA, S.; KOJIMA, S.; TAMURA, S.; FUJINAGA, S.; BENNO, Y.; NAKASE, T. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p. 435–439, 1994.

THERIAULT, S. M. Moving up or moving out: Career ceilings and congressional retirement. **Legislative Studies Quarterly**, v. 23, p. 419–433, 1998.

TOBA, T.; ABE, S.; ADACHI, S. Modification of KPL medium for polysaccharide production by *Lactobacillus* sp. isolated from kefir grain. Japanese **Journal of Zootechnology Science**, v. 58, p. 987–990, 1987.

TOLIOPOULOS, I.; SIMONS, Y.; VERGINADIS I.; PAPANDREOU D.; OIKONOMIDIS, S. A. Evangelou Anticancer activities of kefir against LMS and K562 cell lines by flow cytometry analysis. **Nutrition & Food Science**, v. 42, p. 261-270, 2012.

TÚRMINA, Janaína Ângela. **Avaliação da toxicidade subcrônica in vivo do exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI**. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Centro Oeste, 2012

UNANUE, E. R.; BENACERRAF, B. **Bases celulares da imunidade**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e imunopatologia**, v. 24, n.4, 2014.

VICENTE, Juarez. **Determinação da incerteza expandida associada a análise de açúcares redutores pelo método de Lane-Eynon**. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Tecnologia e Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia de alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Tecnologia, 2010.

VINDEROLA G.; PERDIGON G.; DUARTE J.; THANGAVEL D.; FARNWORTH E.; MATAR C. Effects of kefir fractions on innate immunity. **Immunobiology**, v. 211, p. 149–156, 2006.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. β -1,3-Glucan in Cancer Treatment. **American Journal of Immunology**, v.8, n. 2, p. 38-43, 2012.

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

WANG, Z.; GUO, Y; YUAN, J.; ZHANG, B. Effect of Dietary β -1,3/1,6-glucan Supplementation on Growth Performance, Immune Response and Plasma Prostaglandin E₂, Growth Hormone and Ghrelin in Weanling Piglets. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 21, n. 5, p. 707 – 714, 2008a.

WANG, Y.; AHMED, Z.; FENG, W.; LI, C.; SONG, S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 283–288, 2008b.

WANG, M.; BI, J. Modification of characteristics of kefiran by changing the carbon source of *Lactobacillus kefirianofaciens*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 763–769, 2008.

WANG, Y.; Li, C.; LIU, P.; AHMED, Z.; XIAO, P.; BAI, X. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 895-903, 2010.

WANG, L.; JIANG, R.; SONG, S. D.; HUA, Z. S.; WANG, J. W.; WANG, Y. P. *Angelica sinensis* polysaccharide induces erythroid differentiation of human chronic myelogenous leukemia k562 cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16 p. 3715-3721, 2015a.

WANG, J. I.; ZHAO, X.; TIAN, Z.; HE, C.; YANG, Y.; YANG, Z. Isolation and Characterization of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus plantarum* SKT109. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 65, p. 269–280, 2015b.

WEI X.; MAO, F.; CAI, X.; WANG, Y. Composition and bioactivity of polysaccharides from tea seeds obtained by water extraction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 587–590.4, 2011.

WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines**, v. 2, p. 251-286, 2015.

YUKSEKDAG, Z. N.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 37, p. 663–667, 2004.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 275-288, 2016.



ANEXO A - ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA SCIENTIA PLENA

Caracterização e atividade citotóxica de polissacarídeo obtido de kefir frente a linhagens de células tumorais

Characterization and cytotoxic activity in tumor cells of kefir polysaccharides extracted in alkaline solution

R. S. Picasso¹, R. J. S. A. Padilha¹, M. do D. Rodrigues², S. C. do Nascimento², C. S. de A. Lima¹, R. Yara^{3*}.

¹*Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil*

²*Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, 50740-525, Recife, PE, Brazil*

³*Departamento de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil.*

*ricardo.yara@ufpe.br

(Recebido em dia de mes de ano; aceito em dia de mes de ano)

Os polissacarídeos possuem aplicações em diferentes áreas, como alimentícias, têxteis, petróleo, papel, cosméticas e farmacêuticas. O consórcio microbiano de kefir produz exopolissacarídeos a partir de substratos variados e são tradicionalmente extraídos em soluções aquosas neutras usando calor. Estudos demonstram que polissacarídeos possuem inúmeras aplicações terapêuticas, atuando inclusive como antineoplásicos. Realizou-se a extração de polissacarídeos de grãos de kefir cultivados em água. A presença do carboidrato foi confirmada pelo teste de Molisch. Após análise espectroscópica de UV-Vis observou-se ausência de ácidos nucleicos e proteínas. A análise por Infravermelho com Transformada de Fourier confirmou a presença de hidroxilas e carboxilas. Ensaio de citotoxicidade foram realizados utilizando-se células tumorais onde foi observado um marcante potencial citotóxico (70%) para Leucemia mielocítica crônica (K-562) e moderado (58%) para adenocarcinoma de mama humano (MCF-7).

Palavras-chave: kefir 1, polissacarídeo 2, citotoxicidade 3

Polysaccharides have applications in different areas, such as food, textiles, petroleum, paper, cosmetics and pharmaceuticals. The kefir microbial consortium from different substrates, produces exopolysaccharides and have being traditionally extracted from neutral aqueous solutions using high temperatures. Studies show that polysaccharides have several therapeutic applications, even acting as antineoplastic agents. The polysaccharides obtained from kefir grains was carried out in water. The carbohydrate was confirmed by Molisch's essay. The UV-Vis analysis shows absence of nucleic acids and proteins. The Infrared analysis confirmed hydroxyl and carboxylic acids groups. Cytotoxicity assays using tumor line cells shows a marked cytotoxic potential (70%) for chronic (K-562) and moderate (58%) chronic myelocytic leukemia for human breast adenocarcinoma (MCF-7).

Keywords: kefir 1, polysaccharide 2, cytotoxicity 3

1. INTRODUÇÃO

Polissacarídeos são macromoléculas compostas por várias unidades de monossacarídeos e nos organismos vivos são sintetizados em diferentes estágios do ciclo de vida [1]. Os polissacarídeos possuem características favoráveis para uso em várias áreas industriais, dentre elas alimentícias, têxteis, cosméticas e farmacêuticas, pois são renováveis, biodegradáveis e não tóxicos [2]. Estudos também demonstram que polissacarídeos possuem atividades biológicas relevantes, tais como, propriedades antitumorais devido a suas características estruturais ou ainda pela presença ou não de cargas iônicas [3,4].

O kefir é um probiótico que possui uma mistura de bactérias e leveduras [5]. As bactérias dos grãos de kefir podem ser ácido-lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*) e ácido-acéticas (espécies de *Acetobacter*). Dentre as bactérias identificadas anteriormente podemos citar

Lactobacillus brevis [6, 7], *Lb. viridescens*, *Lb. gasseri*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei* [6], *Lb. kefir* [6, 8], *Lb. kefiranofaciens* [9], *Lb. kefirgranum*, *Lb. parakefir*, [10] *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [11], *Leuconostoc mesenteroides* [12] e *Acetobacter sicerae* sp. nov. [13]. As leveduras contidas nos grãos de kefir podem ser *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, espécies de *Candida* e *Torulopsis* [7, 14, 15, 16].

Em relação ao cultivo do kefir podem-se utilizar diversos substratos como fontes de carboidratos, destacando-se o leite [17] e o açúcar mascavo [18]. Por outro lado, o consorcio de kefir produz exopolissacarídeos como a kefirana, que consiste de uma glucogalactana ramificada, solúvel em água, possuindo quantidades equivalentes de resíduos D-glucose e D-galactose; reconhecidos pela sua ação antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória, sendo utilizado popularmente como coadjuvante no tratamento de diversas enfermidades [19, 20, 21, 22].

O câncer é um importante problema de saúde pública mundial e é a segunda principal causa de morte nos Estados Unidos [23]. Não obstante, o surgimento de linhagens resistentes aos medicamentos disponíveis torna relevante a pesquisas por novas estratégias e compostos antitumorais [24]. Dentre estes os polissacarídeos têm atraído a atenção pelo fato de serem pouco tóxicos para as células normais do hospedeiro e efetivo contra células tumorais [25]. Em 1982, Shiomi et al. [26] publicaram o primeiro trabalho sobre atividade antitumoral *in vivo* de um polissacarídeo extraído dos grãos de kefir.

Este trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização de polissacarídeos do kefir por extração alcalina e verificar a ação citotóxica deste frente a linhagens tumorais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo do kefir e extração do polissacarídeo

A cultura do kefir foi mantida em solução de açúcar mascavo e 50 mL da mesma (50 g.L^{-1}) foi utilizada para cada 5g de kefir cultivado. Os grãos foram mantidos sob temperatura ambiente (20-30 °C). Neste método de cultivo as repicagens foram realizadas a cada 48h. Após cultivado toda a quantidade de kefir necessária para realização de todos os testes, o mesmo foi congelado e clareado. No clareamento, o kefir foi lavado e impurezas foram retiradas manualmente com ajuda de uma pinça. Esse processo foi realizado de 12 a 15 vezes. A extração do polissacarídeo foi realizada pelo protocolo descrito por Moreira [22] e modificado por Silva [27].

2.2 Caracterização estrutural do polissacarídeo extraído do kefir

2.3 Teste de Molisch

O Teste de Molisch foi usado para confirmar a presença de carboidrato. Para tanto, foi preparada uma solução de 5 mg/ 5mL de polissacarídeo acrescido de 3 gotas de Alfa-naftol a 5%, em seguida foi adicionado 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4), sendo acrescentado com o tubo inclinado e lentamente. A ocorrência de um anel roxo indica a presença de açúcares [28].

2.4 Espectroscopia UV-VIS

Com a finalidade de detectar grupos cromóforos oriundos de impurezas, o polissacarídeo foi diluído em água tipo I (1mg/mL) com auxílio de um sonificador e analisado em Espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) na região compreendida entre 200-700nm.

2.5 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

A identificação dos grupos funcionais do exopolissacarídeo extraído dos grãos de kefir foi realizada utilizando um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Agilent Technologies Cary 630FTR) e módulo ATR. A amostra (10mg) foi prensada e os espectros de transmissão foram coletados mediante resolução de 8, 4 scans, sob uma varredura de 4000 a 750 cm^{-1} .

2.6 Avaliação citotóxica

As linhagens celulares MCF- 7 (adenocarcinoma de mama humana), K-562 (leucemia mielocítica crônica) e HEP-2 (carcinoma de laringe humana) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, e mantidas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO_2 , em meios específicos RPMI 1640 (Gibco) e DMEN (Gibco), com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid) (Gibco) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco), utilizando-se tripsina/EDTA (0,25%) para as repicagens. As células foram plaqueadas até uma densidade de $0,3 \times 10^5$ (linhagem em suspensão) e 1×10^4 (linhagem aderida) por poço, em placas de 96 poços. Às linhagens foram adicionados os polissacarídeos até concentração final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e, em seguida incubadas por 72 horas. Após este período, 25 μL de MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolio) foram adicionados e as células foram reincubadas por 3h. A absorbância foi verificada, após dissolução do precipitado com 100 μL de DMSO, em espectrofotômetro de placas a 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e a percentagem de inibição foi obtida a partir do *GraphPadPrism* 5.0.

Para a atividade citotóxica do polissacarídeo foi utilizada a escala do National Cancer Institute (NCI), onde os compostos considerados sem atividade citotóxica apresentaram-se com a inibição percentual no intervalo de 1 - 20%, aqueles com pouca atividade situa-se entre 20 e 50%, com atividade moderada de 50 para 70% e de alta atividade, quando apresentam um intervalo de inibição entre 70 a 100% [29].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento da extração do carboidrato e teste de Molish

A partir de 350 g do kefir clareado após extração alcalina, foi obtido 28,28g de polissacarídeo (8,08 %). O teste de Molisch realizado com o material após a extração indicou a presença de

carboidratos, demonstrando assim, que o método de extração alcalina foi capaz de extrair o polissacarídeo.

3.2 Espectroscopia UV-VIS

A análise espectroscópica na região do UV-VIS mostrou ausência de proteínas ou grupos aromáticos na amostra, por não apresentar absorções características desses grupos. Wang e colaboradores também utilizaram UV-VIS para verificar a presença de impurezas presentes na extração de polissacarídeos produzidos por *Lb. plantarum* contido no kefir [30, 31].

3.3 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier - IVTF

Foi realizada uma análise a partir da espectroscopia em infravermelho com o polissacarídeo extraído do kefir (**FIGURA 1**).

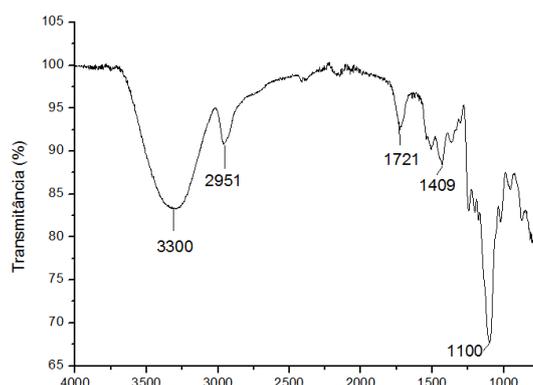


FIGURA 1: Espectroscopia por infravermelho (IVTF) de polissacarídeo extraído dos grãos do kefir.

Os espectros de infravermelho do polissacarídeo obtido do kefir apresentaram: um máximo largo arredondado a 3300 cm^{-1} , indicativo de grupos hidroxila com pontes de hidrogênio intramoleculares. O máximo em 2951 cm^{-1} é atribuído a ligações C-H. Bandas entre 1660 e 1220 cm^{-1} aproximadamente, mostram a presença de ligações assimétricas e simétricas de ligações C-O. A região de impressão digital para hidratos de carbono foram observadas na região entre 1200 - 900 cm^{-1} que estão associadas a carboidratos em anéis (cíclicos) e dos grupos substituintes de cadeia lateral (C-O-C, C-OH e C-H). Os dados obtidos são coerentes com aqueles obtidos por Shahabi-Ghahfarrokhi e colaboradores quando estes pesquisaram kefir originário de leite [32].

3.4 Avaliação citotóxica

Os ensaios de citotoxicidade realizados a partir das linhagens neoplásicas HEP-2, MCF-7 e K562, indicaram que o polissacarídeo apresentou potencial alta citotoxicidade (70%) para Leucemia mielocítica crônica (K-562), moderada (58%) para adenocarcinoma de mama humano (MCF- 7),

enquanto que para o carcinoma de laringe humana (HEP-2) observou-se um discreto potencial citotóxico (31%).

Linhagens de leiomiosarcoma e K-562 foram testadas em meios contendo líquido metabólico de cultura de kefir cultivados em leite, as culturas foram analisadas por citometria de fluxo tendo apresentado resultado de citotoxicidade [33], também foram realizados ensaios em modelo animal que indicaram efetividade do líquido metabólico do kefir [34]. Em ambos os estudos não foi determinado a natureza do composto ativo.

A bioatividade dos polissacarídeos pode ser afetada quando estes compostos interagem com outras substâncias químicas, por diferença na massa molecular, na estrutura ou até por diferenças no método de isolamento, interferindo diretamente na ação final. A atividade antitumoral de polissacarídeo por extração aquosa da planta *Camellia sinensis* atua no sistema imune, estimulando o desenvolvimento das células de defesa e ao mesmo tempo inibindo células K-562 [35]. A multirresistência é uma das principais causas na falha do tratamento do câncer, pois as células neoplásicas possuem mecanismos de resistência a uma grande variedade de fármacos. Os glicopolissacarídeos encontrados no cogumelo *Ganoderma lucidum* por meio do mecanismo de genético de downregulation conseguiriam diminuir a expressão da multirresistência associada a proteínas nas células K562 [36], acredita-se que o polissacarídeo obtido do kefir pode apresentar um mecanismo similar. Exopolissacarídeos obtidos de bactérias como a *Pseudoalteromonas* sp. são conhecidos por inibir significativamente o crescimento da leucemia humana (células K-562) [37], levando-se em conta que na associação existente da cultura do kefir existe uma gama de microorganismos que individualmente podem promover a inibição de tumores. Os resultados obtidos em seu conjunto indicam que o potencial antitumoral do kefir pode estar associado ao seu polissacarídeo.

4. CONCLUSÃO

O teste de citotoxicidade indicou que o polissacarídeo do kefir apresentou um marcante potencial farmacológico, que merece ser caracterizado do ponto de vista físico-químico e biológico em etapas posteriores.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Tecnológico das Cadeias Biossustentáveis (ITCBio), à Superintendência do Desenvolvimento no Nordeste (SUDENE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) por todo suporte.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mahapatra S, Banerjee D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. *Microbiology Insights*. 2013; 6:1-16, doi: 10.4137/MBI.S10957.

2. Freitas F, Alves VD, Pais J, Costa N, Oliveira C, Mafra L, Hilliou L, Oliveira RE, Reis MAM. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource Technology*. 2009; 100:859–865. doi: 10.1016/j.biortech.2008.07.002
3. Mosaddegh M, Gharanjik BM, Naghibi F, Esmaeili S, Pirani A, Eslami Tehrani B, Keramatian B, Hassanpour A. A survey of cytotoxic effects of some marine algae in the Chabahar coast of Oman Sea. *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)*, 2014; 1:27-31.
4. Anisimova NY, Ustyuzhanina NE, Donenko FV, Bilan MI, Ushakova NA, Usov AI, Nifantiev NE, Kiselevskiy MV. Influence of Fucoidans and Their Derivatives on Antitumor and Phagocytic Activity of Human Blood Leucocytes. *Biochemistry (Moscow)*. 2015; 80: 925-933. doi: 10.1134/S0006297915070111.
5. Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J, Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev. Iberoam. Micol.* 2006; 23: 67–74.
6. Angulo L, Lopez E, Lema C. Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). *Journal of Dairy Research*. 1993; 60:263–267. doi: <https://doi.org/10.1017/S002202990002759X>.
7. Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristozova T, Frengova G, Spasov Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002; 28:1–6, doi: 10.1038/sj/jim/7000186.
8. Marshall V, Cole WM, Brooker BE, Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. *Journal of Applied Bacteriology*. 1984, 57:491–497, doi: 10.1111/j.1365-2672.1984.tb01415.
9. Toba T, Abe S, Adachi S. Modification of KPL medium for polysaccharide production by *Lactobacillus* sp. isolated from kefir grain Japanese. *Journal of Zootechnology Science*. 1987, 58: 987–990. <http://doi.org/10.2508/chikusan.58.987>
10. Takizawa S, Kojima S, Tamura S, Fujinaga S, Benno Y, Nakase T, *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains, *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994; 44:435–439, doi:0020-7713/94/\$04.00+0.
11. Bolla PA, Carasi P, Serradel MA, Antoni GL, Kefir-isolated *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhibits the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* in vitro. *Journal of Dairy Research*. 2013, 80: 96–102. doi: [10.1017/S0022029912000623](https://doi.org/10.1017/S0022029912000623).
12. Lin CW, Chen HL, Liu JR, Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. *Australian Journal of Dairy Technology*. 1999, 54: 14-18.
13. Li L, Wieme A, Spitaels F, Balzarini T, Nunes OC, Manaia CM, Van Landschoot A, De Vuyst L, Cleenwerck I, Vandamme P. *Acetobacter sicerae* sp. nov., isolated from cider and kefir, and identification of species of the genus *Acetobacter* by dnaK, groEL and rpoB sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014, 64:2407-15, doi: 10.1099/ijs.0.058354-0

14. Guzel-Seydim Z, Wyffels JT, Seydim AC, Greene AK, Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. *International Journal of Dairy Technology*. 2005; 58: 25-29, doi: 10.1111/j.1471-0307.2005.00177.
15. Ninane V, Mukandayambaje E, Berben G, Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing 16S rDNA variable regions, *Journal of AOAC International*. 2007; 90: 1111–1117.
16. Yuksekdag ZN, Beyatli Y, Aslim B, Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 2004, 37:663–667. doi:10.1016/j.lwt.2004.02.004.
17. Gul O, Mortas M, Atalar I, Dervisoglu M, Kahyaoglu T. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture, *Journal of Dairy Science*. 2015; 98: 1517–1525. doi:10.3168/jds.2014-8755.
18. Miguel MGCP, Cardoso PG, Magalhães KT, Schwan RF, Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011; 27:1875–1884. doi: 10.1007/s11274-010-0646-6.
19. Micheli L, Uccelletti D, Palleschi C, Crescenzi V, Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran, *Appl. Environ. Microbiol*. 1999; 53:69-74.
20. Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP, Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation, *Molecules* 14. 2009; 2535-2554. doi: 10.3390/molecules14072535.
21. Medrano M, Pérez PF, Abraham AG, Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors, *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 122:1–7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.046.
22. **Moreira MEC, Santos MH, Pereira IO, Ferraz V, Barbosa LCA, Schneedorf JM, Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir, *Química Nova*. 2008, 31: 1738-1742. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700027>.**
23. Siegel RL, Miller KD, Jemal A, Cancer statistics, 2016, CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2016, 66:7–30. doi: 10.3322/caac.21332.
24. Shi L, Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016; 92:37–48. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100.
25. Wang L, Jiang R, Song SD, Hua ZS, Wang JW, Wang YP, *Angelica sinensis* polysaccharide induces erythroid differentiation of human chronic myelogenous leukemia k562 cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16: 3715-3721. doi:http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.9.3715.
26. Shiomi M, Sasaki K, Murofushi M, Aibara K, Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. *Jpn. J. Med. Sci. Biol*. 1982; 35: 75- 80.
27. Silva CAS. Preparação e caracterização de filmes poliméricos a base de kefirana para aplicação como suporte para cultivo celular. 2015.

28. Kassakul W, Praznik W, Viernstein H, Hongwiset D, Phrutivorapongkul A, Leelapornpisid P, Characterization of the mucilages extracted from *Hibiscus rosa-sinensis* Linn and *Hibiscus mutabilis* Linn and their skin moisturizing effect. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014; 6: 453-457.
29. Silva TDS, Atividade antitumoral in vitro e in vivo do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (líquen), 2014.
30. Maeda H.; Zhu X.; Suzuki K., Kitamura S. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefir produced by *Lactobacillus kefiranofaciens*, *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 5533. doi: 10.1021/jf049617g.
31. Wang J, Zhao X, Tian Z, He C, Yang Y, Yang Z, Isolation and Characterization of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 from Tibet Kefir. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2015. 65: 269–279. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0023>.
32. Shahabi-Ghahfarrokhi, I., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Yousefi, H. Effect of γ -irradiation on the physical and mechanical properties of kefiran biopolymer film. *Int J Biol Macromol.* 2015; 74; 343-350.
33. Toliopoulos I, Simons Y, Verginadis I, Papandreou D, Oikonomidis S, Evangelou A, Anticancer activities of kefir against LMS and K562 cell lines by flow cytometry analysis, *Nutrition & Food Science.* 2012; 42:261-270. <https://doi.org/10.1108/00346651211248629>.
34. LeBlanc AM, Matar C, Farworth E, Perdigon G, Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer, Model. *Journal of Dairy Science.* 2007; 90: 1920–1928. doi:10.3168/jds.2006-079.
35. Wei X, Mao F, Cai X, Wang Y, Composition and bioactivity of polysaccharides from tea seeds obtained by water extraction, *Int J Biol Macromol.* 2011; 49: 587–590. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.06.016.
36. Wei-dong L, Bo-di Z, Wei R, Liu J, Lin Z. Reversal effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on multidrug resistance in K562/ADM cell line. *Acta Pharmacol Sin.* 2008; 29: 620–627, doi: 10.1111/j.1745-7254.2008.00776.x.
37. Chen G, Qiana W, Lia J, Xua Y, Chen K, Exopolysaccharide of Antarctic bacterium *Pseudoaltermonas* sp. S-5 6 induces apoptosis in K562 cells. *Carbohydrate Polymers.* 2015, 121:107-114. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.045.

ANEXO B – DEPÓSITO DE PATENTE



29/11/2017

870170092510

12:08



29409161710668864

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 025627 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: INSTITUTO TECNOLÓGICO DAS CADEIAS BIODIVERSAS**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica **CPF/CNPJ:**

25682795000196

Nacionalidade: Brasileira**Qualificação Jurídica:** Associação com intuito não econômico**Endereço:** Rua Viscondessa do Livramento 113 Caixa Postal 78 **Cidade:**

Recife

Estado: PE**CEP:** 52010060**País:** Brasil**Telefone:** 81

21268536

Fax:**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO****Email:** projetocad.bio@hotmail.comEsta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 29/11/2017 às 12:08,
Petição 870170092510

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO TIPO

Utilidade (54): BETA-GLUCANA, EXTRAÍDO DE CONSÓRCIO MICROBIANO DO KEFIR, COM CARACTERÍSTICAS DE HIDROGEL SUPERABSORVENTE, AÇÃO CITOTÓXICA PARA LINHAGENS NEOPLÁSICAS, AÇÃO IMUNOMODULADORA E MATÉRIA-PRIMA PARA FILME POLIMÉRICO BIOATIVO

Resumo: Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo beta-glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir, com características de hidrogel superabsorvente, ação citotóxica para linhagens neoplásicas, ação imunomoduladora e matéria-prima para filme polimérico bioativo descreve o processo de extração de um exopolissacarídeo dos grãos de kefir de água utilizando para tanto uma extração em meio alcalino. O polímero isolado é biodegradável, e consiste em um homopolissacarídeo hidrofílico não iônico e pouco solúvel em água, composto por monômeros de glicose, com ligações predominantes β -1-6 (FIGURA 6), caracterizado como uma beta- glucana (β -glucana). Este polímero comporta-se como um hidrogel superabsorvente e possui atividade citotóxicas contra linhagens neoplásica de leucemia mielocítica crônica e adenocarcinoma de mama humano, além de promover o processo de cicatrização pela estimulação da produção de citocinas a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). O polímero isolado ainda pode ser utilizado como matéria-prima para produção de filmes bioativos para aplicações biomédicas.

FIGURA a publicar: Fig 6