

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA ROSA MACHADO PRADO

**PRODUÇÃO DE COMPOSTO BIOATIVO A BASE DE POLISSACARÍDEO E  
PROTEÍNA COM ATIVIDADES ANGIOGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA  
UTILIZANDO CULTURA MISTA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS DO KEFIR  
TIBETANO EM SORO DE LEITE**

CURITIBA

2014

MARIA ROSA MACHADO PRADO

**PRODUÇÃO DE COMPOSTO BIOATIVO A BASE DE POLISSACARÍDEO E  
PROTEÍNA COM ATIVIDADES ANGIOGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA  
UTILIZANDO CULTURA MISTA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS DO KEFIR  
TIBETANO EM SORO DE LEITE**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção ao grau de Doutor em Engenharia de Bioprocesso e Biotecnologia no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocesso e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2014

*Aos meus pais **Antonio e Maria Adorides**, a meu esposo **Jaime** e a minha filha **Helena** dedico com muito amor este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela orientação, incentivo e principalmente pela confiança.

Aos professores Dr. Aristóteles Góes Neto, Dr Juliana de Dea linder, Rosália Rubel e Adriane B. P. Medeiros, por terem aceitado avaliar este trabalho.

Ao professor Dr. Miguel Nosedá por gentilmente ceder seu laboratório para que fossem realizadas as análises de estudo da estrutura química.

A professora Dr<sup>a</sup>. Roseane Gutter Mello Zibetti, por gentilmente permitir que eu pudesse utilizar as instalações do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomas Soccol, Dr<sup>a</sup>. Adenise L. Woiciechowski, Dr<sup>a</sup>.. Adriane B. P. Medeiros, Dr. Júlio C. de Carvalho, Dr<sup>a</sup>. Luciana P. S. Vandenberghe, Msc. Luiz A. J. Letti e Dr<sup>a</sup>. Michele R. Spier pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos Fernanda Vasconcellos, Denise Salmon, Mara Eli, Caroline Tieme, Leandro Freire, Marcio Vasconcelos, Gilberto Vinicius e Fernanda Fiorda com vocês aprendi o quanto é bom ter amigos verdadeiros e companheiros em todos os momentos.

À Mitiyo e Michelle C. T. Batista, por serem amigas fiéis em todos os momentos.

Ao Christian Boller, por ser um amigo e companheiro sempre presente durante todos os experimentos e principalmente por estar sempre ao meu lado.

Aos colegas Pauline, Siliane, Jenifer, Cassiano, Joana, Mário, Valesca, Juliana Oliveira, pelos momentos de descontração e cooperação.

A toda a minha família, pelo carinho e apoio durante esta etapa de minha vida.

A Deus, por me guiar durante toda a minha vida.

## RESUMO

A pesquisa de novas biomoléculas com atividade biológica é de suma importância para as indústrias farmacêuticas, indústrias de cosméticos e indústrias alimentícias. As pesquisas envolvendo a obtenção de novas substâncias principalmente por biotecnologia tem-se intensificado sempre com o intuito de aproveitar resíduos das indústrias agroalimentares e agregar valor as substâncias produzidas. O presente trabalho teve como objetivo pesquisar e produzir extrato composto por biomoléculas como polissacarídeo e proteína a partir de cultura mista do kefir tibetano utilizando como meio fermentativo o soro de leite, caracterizar a composição monossacarídica do polissacarídeo, comprovar atividade biológica de modulação angiogênica e anti-inflamatória, desenvolver formulação com a incorporação deste extrato. Este trabalho foi dividido em quatro capítulos, o primeiro capítulo consiste em revisão bibliográfica para um maior conhecimento do que já existe sobre o assunto abordado e fundamentar a necessidade da pesquisa realizada. O capítulo 2, foi utilizado cultura mista de bactérias ácida láctica e leveduras do kefir tibetano, na sequência realizou-se a seleção de substrato para o processo de fermentação com a definição da composição por meios analíticos, para aumentar a produção do extrato composto por polissacarídeo e proteína foi realizada a otimização dos parâmetros fermentativos por meio de planejamentos estatísticos, cinética da produção em biorreator, também foi feita a composição monossacarídica do polissacarídeo presente no extrato. Foi utilizado soro de leite, um subproduto da cadeia do leite, como substrato e após a otimização do meio de cultura, foi possível obter uma produção de 4,58 g/L de ExPP liofilizado. Esta produção foi maior do que as relatadas na literatura, utilizando cultura de BAL. A composição monossacarídica do ExPP é composta por galactose (39%), glicose (28%) e manose (26%) em concentração mais elevadas classificando-o como um heteropolissacarídeo. No capítulo 3 foi avaliada a atividade moduladora da angiogênese do extrato composto por polissacarídeo e proteína liofilizado pelo método *ex-ovo*, avaliado também a atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase e avaliado a citotoxicidade do extrato em cultivo de células Vero. Na avaliação da atividade angiogênica deste extrato foi definida a concentração EC50 de 192 ng/mL e confirmado que ele é uma substância pró angiogênica com bons resultados na estimulação de novos vasos sanguíneos. Quanto à atividade anti-inflamatória o extrato liofilizado apresentou uma ação inibidora da enzima hialuronidase. E o extrato liofilizado apresentou segurança quanto a citotoxicidade. No capítulo 4 foram desenvolvidas duas formulações de géis e realizado os testes de estudo de estabilidade acelerada, avaliações microbiológicas e avaliação da atividade anti-inflamatória dos géis. As duas formulações apresentaram segurança em relação a presença de microrganismos e eficazes no quesito de ação do conservante utilizado. No estudo da estabilidade os dois géis são estáveis à temperatura de 40°C em relação à atividade anti-inflamatória, mas estáveis nas outras temperaturas testadas. Conclui-se, portanto que a produção de extrato composto por polissacarídeo e proteína a partir de cultura mista do kefir tibetano foi a maior já relatada e que o polissacarídeo presente no extrato é um heteropolissacarídeo. O extrato possuía atividade promotora da angiogênese com dose-efeito na formação de novos vasos e atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase excelente sendo superior ao produto comercial comparado. Os géis contendo o extrato composto por polissacarídeo e proteína, foram estáveis nas temperaturas de -10°C e ambiente mantendo a atividade anti-inflamatória e as duas formulações são seguras em relação à avaliação microbiana.

**PALAVRAS-CHAVE:** extrato composto por polissacarídeo e proteína; atividade moduladora da angiogênese; atividade anti-inflamatória; kefir tibetano; soro de leite.

## ABSTRACT

The research of new biomolecules with biological activity is of substantial importance to the pharmaceutical, cosmetics and food industries. The researches involving the acquisition of new substances mainly by biotechnology have been intensified always with the intention of profit by residues of agrifood industries and aggregate value to produced substances. The present job had as objective to research and produce composed extract by biomolecules as polysaccharide and protein since the mixed culture of the kefir using as fermentative way the whey, to feature the monosaccharide composition of the polysaccharide, to prove biological activity of angiogenic and anti-inflammatory modulation, to develop formulation with the incorporation of this extract. This job was divided in four chapters, the first one consists in bibliographic revision to a bigger knowledge about what already exists around the subject and to underlie the necessity of the realized research. At chapter 2 we show the usage of mixed culture of lactic acid bacteria and kefir yeasts, it was realized the selection of substrate to the fermentation process with the composition definition by analytical ways, to increase the extract production composed by polysaccharide and protein it was realized the optimization of the fermentative production by means of statistical plannings, production kinetics in bioreactor, it also was done the monosaccharide composition of polysaccharide presented in the extract. Whey was used, a subproduct of the milk chain, as substrate and after the optimization of the culture way it was possible to obtain a production of 4,58 g/L of ExPP freeze-dried. This production was bigger than the ones related at literature, using culture of BAL. The monosaccharide composition of the ExPP is composed by galactose (39%), glucose (28%) and mannose (26%) in more elevated concentration classifying it as a heteropolysaccharide. In chapter 3 it was evaluated the modulated activity of the composed extract angiogenesis by polysaccharide and freeze-dried protein by the *ex-ovo* method, it was also evaluated the anti-inflammatory activity by the inhibition of the hyaluronidase and evaluated the cytotoxicity of the extract in Vero cells. In the angiogenic activity of this extract it was defined the concentration EC50 of 192 ng/mL and confirmed that it is a pro-angiogenic substance with good results in the new blood vessels. Relating to anti-inflammatory activity the freeze-dried extract showed an inhibitor action of the hyaluronidase enzyme. The freeze-dried extract showed security relating to the cytotoxicity. In chapter 4 two gel formulations were developed and accelerated stability tests were done, microbiological evaluations and evaluation of the gel anti-inflammatory activity. Both formulations showed security relating to microorganisms presence and efficient in enquiry of conservation action used. In the stability study both gels are unstable at 40°C in relation to the anti-inflammatory activity, but stable at other tested temperatures. So is concluded that the production of composed extract by polysaccharide and protein since the mixed culture of kefir was the major already related and that the polysaccharide presented in the extract is a heteropolysaccharide. The extract owned activity promoter of angiogenesis with dose-effect in new vessels formation and anti-inflammatory activity by the excellent inhibition of the hyaluronidase enzyme being superior than the purchased commercial product. The gels containing the composed extract by polysaccharide and protein were stable at temperatures of -10°C and environmental, keeping the anti-inflammatory activity and the two formulations are secure relating to microbial evaluation.

**KEYWORD:** extract composed by polysaccharide and protein, angiogenic activity, anti-inflammatory activity, Tibetan kefir, whey.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### **CAPÍTULO I. REVISÃO**

FIGURA 1. GRÃOS DE KEFIR.....	26
FIGURA 2. PRODUÇÃO BRASILEIRA DE LEITE DESDE 2008 EM BILHÕES DE TONELADAS.....	33
FIGURA 3. FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DO SORO DE LEITE A PARTIR DA PRODUÇÃO DE QUEIJO.....	34
FIGURA 4: VASCULOGÊNESE E ANGIOGENESE.....	37
FIGURA 5. FORMAÇÃO DE NOVOS VASOS.....	39
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO DOS RECEPTORES PARA PROMOTORES E INIBIDORES DA ANGIOGÊNESE.....	41
FIGURA 7. FOTOGRAFIA DE UM EMBRIÃO COM 48 HORAS DE INCUBAÇÃO EM INCUBADORA A 36,5°C.....	43
FIGURA 8. ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	45

### **CAPÍTULO II. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA PRODUZIDO POR KEFIR TIBETANO**

FIGURA 1. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ExPP EM BIORREATOR.....	63
FIGURA 2. PRODUÇÃO DE ExPP EM DIFERENTES SUBSTRATOS E DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO.....	67
FIGURA 3. PRODUÇÃO DE ExPP EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TAMPÃO.....	69
FIGURA 4. DIAGRAMA DE PARETO PARA DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	71
FIGURA 5. DIAGRAMA DE PARETO PARA DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO.....	72

FIGURA 6. GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DEMONSTRANDO AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES GLICOSE E PEPTONA NA PRODUÇÃO DE ExPP.....	73
FIGURA 7. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ExPP (g/L), BIOMASSA (g/L) E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS DURANTE 54 H DE FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR.....	76
FIGURA 8. EVOLUÇÃO DA TAXA DE PRODUÇÃO DE ExPP.....	76
FIGURA 9 ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO ExPP.....	78

### **CAPÍTULO III. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTI-INFLAMATÓRIO PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE DO EXTRATO COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO E PROTEÍNAS OBTIDO DO KEFIR TIBETANO**

FIGURA 1. ESQUEMA DE FOTOS DEMOSTRANDO A METODOLOGIA EX-OVO PARA AVALIAR A ANGIOGÊNESE.....	88
FIGURA 2. ESQUEMA DE FOTOMICROGRAFIAS DEMONSTRANDO O TRATAMENTO DA IMAGEM PELO PROGRAMA IMAGEJ®.....	95
FIGURA 3. DETERMINAÇÃO DA EC50 PARA O ExPP L.....	96
FIGURA 4. DETERMINAÇÃO DA EC50 PARA O VEGF.....	95
FIGURA 5. COMPARAÇÃO ENTRE A CURVA-RESPOSTA PARA O VEGF E O ExPP L.....	98
FIGURA 6. COMPARAÇÃO ENTRE OS LOGS DAS CONCENTRAÇÕES DE VEGF E ExPP L.....	99
FIGURA 7. DETERMINAÇÃO DA IC50 PARA O HIDROCORTICÓIDE.....	100
FIGURA 8. COMPARAÇÃO ENTRE A CURVA-RESPOSTA PARA O ExPP L E O HIDROCORTICÓIDE.....	100
FIGURA 9. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE DE DIFERENTES EXTRATOS DE POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA.....	102

FIGURA 10. CURVA DOSE RESPOSTA INIBIDORA (IC50) DO ExPP L.....	103
FIGURA 11. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ExPP L E DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS.....	104
FIGURA 12. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ExPP L.....	106

#### **CAPÍTULO IV. DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO COM EXTRATO COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE**

FIGURA 1. FLUXOGRAMA DE DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO COM BIOMOLÉCULA.....	113
FIGURA 2. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE PARA AS DUAS FORMULAÇÕES.....	124

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I. REVISÃO

TABELA 1. CEPAS BACTERIANAS ENCONTRADAS EM KEFIR DE DIFERENTES ORIGENS.....	28
TABELA 2. LEVEDURAS E FUNGOS ENCONTRADOS EM KEFIR DE DIFERENTES ORIGENS.....	29
TABELA 3. ATIVIDADE BIOLÓGICA DO KEFIRAN.....	32
TABELA 4. RELAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRÓ-ANGIOGÊNESE E ANTI-ANGIOGÊNESE.....	42

### CAPÍTULO II. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA PRODUZIDO POR KEFIR TIBETANO

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DO MEIO E CONDIÇÕES PARA FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A PRODUÇÃO DO ExPP POR CULTURA MISTA.....	59
TABELA 2. PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN (11/12) PARA A PRODUÇÃO DE ExPP COM 7 VARIÁVEIS INDEPENDENTES, 4 VARIÁVEIS FALSAS, 4 PONTOS CENTRAIS (PC) E OS VALORES DECODIFICADOS.....	60
TABELA 3. PLANEJAMENTO FATORIAL ( $2^{5-1}$ ) PARA A PRODUÇÃO DE ExPP COM 5 VARIÁVEIS INDEPENDENTES, 4 PONTOS CENTRAIS (PC) E OS VALORES DECODIFICADOS.....	61
TABELA 4. DELINEAMENTO CENTRAL COMPOSTO ROTACIONAL (CCRD). VALORES DECODIFICADOS E VALORES DE NÍVEIS DE FATORES TESTADOS CODIFICADOS: GLICOSE, PEPTONA BACTERIOLÓGICA, SULFATO DE MAGNÉSIO E SULFATO DE MANGANÊS.....	62
TABELA 5. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORO DE LEITE.....	66
TABELA 6. PARÂMETROS CINÉTICO PARA A PRODUÇÃO DE ExPP.....	75
TABELA 7. AUMENTO NA PRODUÇÃO DE ExPP DURANTE AS ETAPAS DE OTIMIZAÇÃO.....	77
TABELA 8. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO ExPP.....	78

#### **CAPÍTULO IV. DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO COM EXTRATO COMPOSTO POR POLISSAÇARÍDEO E PROTEÍNA COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE**

TABELA 1. TIPOS DE ESTABILIDADE ESTUDADA.....	115
TABELA 2. FÓRMULA GEL 1ExPP L.....	117
TABELA 3. FÓRMULA GEL 2ExPP L.....	117
TABELA 4. RESULTADOS DA CONTAGEM DE MESÓFILAS, BOLORES E LEVEDURAS E PESQUISA DE PATÓGENOS.....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAB - bactérias ácido acéticas

Ang - angiopoetinas

BAL - bactérias ácido lácticas

BSA - albumina de soro bovino

°C - graus Celsius

CAM - *coriolantoic membrane assay*

cAMP - monofosfato cíclico de adenosina

CCDR - delineamento composto central rotacional

C:N - relação carbono nitrogênio

DMAB - dimetilaminobenzaldeído

DMSO - dimetil sulfoxido

EC - concentração estimulatória

EPS - exopolissacarídeo

EPC - células precursoras endoteliais

ExPP – composto a base de polissacarídeo e proteína

ExPP C - composto a base de polissacarídeo e proteína congelado

ExPP D - composto a base de polissacarídeo e proteína dializado

ExPP L - composto a base de polissacarídeo e proteína liofilizado

ExPP Pt - composto a base de polissacarídeo e proteína precipitado

*et al* - e outros

FBS - *fetal bovine serum*

FGF - fator de crescimento dos fibroblastos

g - grama

h - hora

IC - concentração inibitória

Kg - quilograma

L - litro

log - logaritmo

log [] - logaritmo da concentração

m - metro

M - molar

MC - membrana corioalantóica  
mg - miligrama  
mg/mL - miligrama por mililitro  
min - minuto  
mL - mililitro  
mm - milímetro  
MRS - Man, Rogosa e Sharpe  
n - número de amostras  
N - normal  
ng - nanograma  
nm - nanômetro  
p - peso  
p/v - peso por volume  
PBS - *phosphate buffered saline*  
P/S - Penicilina e Streptomicina  
qsp - quantidade suficiente para  
RBC - *Rose Bengal Cloranphenicol*  
RMN - Ressonância magnética nuclear  
µg - micrograma  
µL - microlitro  
UHT - *Ultra High Temperature*  
UFC - Unidades formadoras de colônias  
v - volume  
v/v - volume por volume  
VEGF - fator de crescimento vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 OBJETIVOS .....	21
1.1.1 Objetivo Geral .....	21
1.1.2 Objetivos Específicos .....	21
<b>CAPÍTULO I. REVISÃO</b> .....	23
1. KEFIR .....	23
<b>2. COMPOSIÇÃO MICROBIANA DO KEFIR</b> .....	26
<b>3. POLISSACARÍDEO</b> .....	30
<b>4. SORO DE LEITE</b> .....	33
<b>5. ATIVIDADE BIOLÓGICA</b> .....	36
5.1 ATIVIDADE ANGIOGÊNICA .....	36
5.1.1 Formação de neovasos.....	36
5.1.2 Fatores que controlam a formação de neovasos.....	39
5.1.3 Fatores angiogênicos estimuladores e inibidores e seu mecanismo de ação	40
5.1.4 Modelo experimental <i>in vivo</i> da angiogênese.....	42
5.2 ATIVIDADE INIBIDORA DA ENZIMA HIALURONIDASE NO PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	44
5.2.1 Ácido hialurônico.....	44
5.2.2 Enzima hialuronidase.....	45
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47
<b>CAPÍTULO II. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA PRODUZIDO POR KEFIR TIBETANO .</b>	54
<b>RESUMO</b> .....	54
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	55
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	57
2.1 CULTURA DE MICRORGANISMOS .....	57
2.2 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SORO DE LEITE .....	57
2.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXPP POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	58
2.3.1 Seleção de substratos.....	58
2.3.2 Estudo do efeito do pH durante a fermentação submersa.....	59
2.3.3 Delineamento experimental.....	59

2.3.4 Cinética da produção de ExPP em biorreator.....	62
2.4 ANÁLISES QUANTITATIVAS .....	63
2.5 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ExPP .....	64
2.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO ExPP ....	64
2.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	65
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SORO DE LEITE .....	66
3.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXPP POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	67
3.2.1 Seleção de substrato.....	67
3.2.2 Efeito do controle de pH durante a produção do extrato composto por polissacarídeo e proteína.....	68
3.2.3 Delineamento experimental.....	70
3.2.4 Cinética da produção de ExPP em biorreator.....	74
3.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO ExPP .....	77
3.4 ANÁLISE DE RMN 13C.....	78
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO III. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIO PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE DO EXTRATO COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO E PROTEÍNAS OBTIDO DO KEFIR TIBETANO .....</b>	<b>84</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>84</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>87</b>
2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA .....	87
2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA .....	87
2.2.1 Análise da atividade angiogênica .....	90
2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE .....	90
2.3.1 Análise da atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronida	
2.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE .....	
2.4.1 Células Vero.....	~ .
2.4.2 Cultivo e expansão das células Vero.....	92

2.4.3 Teste de Viabilidade Celular por MTT.....	93
2.4.4 Análise da citotoxicidade.....	93
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	94
<b>3. RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA .....	95
3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE .....	101
3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE .....	104
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>110</b>
<b>CAPÍTULO IV. DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO COM EXTRATO COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA COM ATIVIDADE ANTI- INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE .....</b>	<b>112</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>112</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>116</b>
2.1 OBTENÇÃO DO ExPP L .....	116
2.2 FORMULAÇÃO .....	116
2.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE .....	117
2.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA .....	118
2.4.1 Contagem de bactérias mesófilas e fungos .....	118
2.4.2 Pesquisa De Patógenos .....	119
2.4.3 Teste Desafio – <i>Challenge Test</i> .....	119
2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	120
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	120
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>121</b>
3.1 ESTUDO DA ESTABILIDADE .....	121
3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	122
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE .....	123
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>125</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>126</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Existe grande procura por novas moléculas, extratos e substâncias que apresentem propriedades benéficas à saúde, ou atividade biológica comprovada para que possam ser incorporadas a novos produtos sejam farmacêuticos, cosmecêuticos ou em produtos alimentícios classificados como alimentos funcionais e nutracêuticos. Este interesse tem impulsionado os setores de pesquisa acadêmicos ou industriais a desenvolverem novas tecnologias, novos processos, novas metodologias analíticas com o intuito de descobrir e analisar estas moléculas, extratos ou substâncias.

O kefir é uma bebida fermentada que possui várias propriedades benéficas a saúde, esta bebida é obtida a partir de grãos de kefir, o qual é formado por cultura mista de bactérias ácido lácticas, bactérias acéticas e leveduras, e alguns destes microrganismo são classificados como probióticos. As propriedades benéficas do kefir não estão apenas associadas a sua microflora, mas também a presença de kefiran, o qual é produzido pelos microrganismos do kefir, foi relatado como um dos responsáveis pelas características funcionais, e que ainda não foram completamente elucidadas (RIMADA e ABRAHAM, 2006).

O Brasil é o sexto país produtor de leite com uma produção de 35 bilhões de litros em 2013, e o estado do Paraná é o terceiro produtor com produção de aproximadamente 680 milhões de litros de leite em 2013 (IBGE, 2014; USDA, 2014). O soro de leite faz parte da cadeia produtiva de leite sendo considerado um subproduto que na sua maioria é subaproveitado e todo o excedente é descartado como resíduo e muitas vezes não é devidamente tratado gerando problemas ambientais.

O soro de leite apresenta em sua composição uma concentração considerada de carboidratos aproximadamente 4,5 % e concentração de proteínas de 0,5%, também são encontrados minerais e gorduras. Desta maneira, o soro de leite pode ser utilizado em processos fermentativos para a produção de diferentes biomoléculas.

A descoberta de uma biomolécula envolve várias etapas e planejamentos desde a escolha dos microrganismos, meio de cultura, otimização dos parâmetros de produção, caracterização da biomolécula, avaliação da sua atividade biológica e incorporação em uma formulação final com a avaliação da mesma.

O estudo da atividade biológica como a modulação angiogênica é de suma importância, pois angiogênese esta diretamente relacionada com processos de reparação tecidual no caso da cicatrização, desenvolvimento da circulação colateral em tecidos isquêmicos, na formação de corpo lúteo, endométrio e placenta entre outros, mas também pode estar envolvido em quadros patológicos como artrite reumatoide e hemangiomas. Este tipo de modulação envolve várias substâncias pró-angiogênicas e anti-angiogênicas para deflagrar o processo e para inibi-lo (FOLKMAN, 1987; DIAS *et al.*, 2002; ADANS e ALITALO, 2007).

O processo inflamatório é constituído por uma série de eventos que estão relacionados com lesão de tecidos ou infecção. O estudo de substâncias ou moléculas que possuam atividade anti-inflamatória pode ser avaliado pela capacidade de inibir a enzima hialuronidase. A hialuronidase é uma enzima que tem a capacidade de hidrolisar o ácido hialurônico, um polímero viscoso, que geralmente localiza-se no interstício celular, e que este diretamente relacionado com os processos inflamatórios (BORNSTEIN e SAGE, 2002; AL-HAJJ *et al.*, 2003).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo pesquisar e produzir composto por biomoléculas como polissacarídeo e proteína a partir de cultura mista do kefir tibetano utilizando como meio fermentativo o soro de leite, caracterizar a composição monossacarídica do polissacarídeo, comprovar atividade biológica de modulação angiogênica e anti-inflamatória e desenvolver formulação com a incorporação deste extrato.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de produção do composto a base de polissacarídeo e proteína, utilizando leite e soro de leite com cultura mista de bactérias ácido lácticas e leveduras a partir do kefir tibetano.

- Otimizar os parâmetros fermentativos para aumentar a produção do composto a base de polissacarídeo e proteína e definir o processo de recuperação e purificação do composto bioativo
- Caracterizar a composição monossacarídica do polissacarídeo presente no composto bioativo a base de polissacarídeo e proteína.
- Avaliar a atividade moduladora da angiogênese do composto a base de polissacarídeo e proteína, utilizando modelo animal pela técnica *ex-ovo*.
- Estudar a atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase do composto a base de polissacarídeo e proteína.
- Desenvolver formulações farmacêuticas com ação anti-inflamatória incorporando o do composto a base de polissacarídeo e proteína.
- Realizar o estudo de estabilidade das formulações desenvolvidas.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO

#### 1. KEFIR

O kefir é um produto da fermentação ácido-alcoólica do leite com um sabor ligeiramente ácido e consistência cremosa. Este produto originou-se nos Balcãs, na Europa Oriental e na região do Cáucaso (FONTÁN *et al.*, 2006; SERAFINI *et al.*, 2014). Os grãos de kefir têm sido usados há séculos em muitos países, por exemplo, na China, no Tibete, são usados como fermento natural na produção de bebidas lácteas carbonatadas (SALOFF-COSTE, 1996).

A cultura de arranque usada para produzir esta bebida, é uma cultura mista de microrganismos na forma de grãos gelatinosos irregulares, branco/amarelo (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2000). Os grãos de kefir têm uma composição microbiana variável e complexa que inclui espécies de leveduras, bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias acéticas e em alguns tipos de kefir pode ser encontrado micélio de fungos. O grão é uma associação simbiótica de microrganismos que são incorporados numa matriz de polissacarídeo, o qual é composto por glicose e galactose produzido por *Lactobacillus kefiranofaciens* (ANGULO *et al.*, 1993; REA *et al.*, 1996). O crescimento de células e as taxas de produção de polissacarídeo apresentam aumento quando *L. kefiranofaciens* é cultivado numa cultura mista com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CHEIRSILP *et al.*, 2003), o que demonstra a importância da simbiose entre bactérias e leveduras no kefir.

O kefir comercial é tradicionalmente fabricado a partir de leite de vaca, ovelha, cabra ou de búfala. No entanto, em alguns países, o leite é escasso, caro, ou destinado ao consumo relacionado aos costumes religiosos. Portanto, muitos trabalhos estudam a produção de kefir a partir de produtos e subprodutos da indústria alimentícia (KUO e LIN, 1999).

O soro de leite pode ser uma base para a produção de cultura de kefir, bem como para a produção da bebida kefir, além de ser um ótimo meio crioprotetor para processos de congelamento e de secagem por liofilizador. A cultura de kefir liofilizada utilizando o soro de leite como lioprotetor manteve uma elevada taxa de sobrevivência e mostrou boa atividade metabólica e eficiência de fermentação, o que

indica um bom potencial para a sua utilização como uma cultura starter de valor agregado em tecnologia de laticínios (PAPAVASILIOU *et al.*, 2008). Estes estudos mostram perspectivas promissoras para a aplicação de grãos de kefir em estratégias de valorização do soro de leite.

O processo industrial utiliza inoculação direta dos grãos de kefir, e a cultura starter apresenta a composição microbiana bem definida. Além disso, podem ser utilizados microrganismos adjuvantes como as bactérias probióticas dos gêneros *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* probióticos e leveduras probióticas como a *Saccharomyces boulardii*, as quais são adicionadas aos grãos de kefir (WSZOLEK *et al.*, 2006) para a produção de kefir probiótico.

Em países soviéticos, o kefir tem sido consumido por pessoas saudáveis, como medida para reduzir o risco de doenças crônicas, e também foi consumido por pacientes em tratamento clínico de doenças gastrointestinais, metabólicas, hipertensão, doença cardíaca isquêmica e alergias (FARNWORTH e MAINVILLE, 2003; ST-ONGE *et al.*, 2002). A ação benéfica deste leite fermentado pode ser parcialmente atribuída à inibição de microrganismos patogênicos, pela presença de produtos metabólicos, tais como ácidos orgânicos (GARROTE *et al.*, 2000). O consumo de kefir está relacionado com vários benefícios à saúde e bem estar (McCUE e SHETTY, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2005).

As propriedades benéficas do kefir não estão apenas ligados a sua microflora. A presença de kefiran, que é produzido pelos microrganismos do kefir, foi relatado como um dos responsáveis pelas características funcionais, e que ainda não foram completamente elucidadas (RIMADA e ABRAHAM, 2006).

O exopolissacarídeo (EPS) kefiran, produzido pelos microrganismos dos grãos de kefir, melhora a viscosidade e as propriedades viscoelásticas dos géis de leite ácido, e é capaz de formar géis que têm propriedades resistentes a baixas temperaturas (RIMADA e ABRAHAM, 2006). Serafini *et al.* (2014), relataram que o EPS é um heteropolímero (com repetição de unidades de monossacarídeos) que contém glucose e galactose em maiores concentrações. Os mesmos autores descrevem várias propriedades que são promotoras da saúde, atribuídas ao kefiran, tais como a imunomodulação, proteção do epitélio, atividade anti-tumoral entre outras.

Nesse contexto, há interesse comercial crescente no uso de kefir como matriz alimentar adequada para a suplementação com bactérias promotoras de saúde. O

kefir pode atuar não só como um probiótico na bebida natural, mas pode também representar uma matriz eficaz para a entrega de microrganismos probióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

## 2. COMPOSIÇÃO MICROBIANA DO KEFIR

A cultura starter constituída de grãos brancos/amarelos, irregulares e gelatinosos (FIGURA 1) é utilizado na produção de bebidas de kefir (GORSEK e TRAMSEK, 2008), e estes grãos apresentam uma composição microbiana complexa que pode incluir espécies de leveduras, BAL, bactérias acéticas, e algumas espécies de fungos (JIANZHONG *et al.*, 2009).



FIGURA 1. GRÃOS DE KEFIR  
FONTE: BANCO DE IMAGENS GOOGLE

A composição microbiana pode variar de acordo com a origem do kefir, o substrato utilizado no processo de fermentação e os métodos utilizados para a manutenção da cultura microbiana. O kefir tibetano, que é usado na China, é composto na sua maioria por *Lactobacillus*, *Lactococcus* e levedura. Além disso, as bactérias acéticas foram identificadas em kefir tibetano obtido de algumas regiões específicas da China (XIAO e DONG, 2003; YANG *et al.*, 2007). A composição do kefir tibetano difere do russo, do irlandês, de Taiwan e do kefir da água. Esta diversidade microbiana é responsável pelas características físico-químicas e atividades biológicas de cada kefir (JIANZHONG *et al.*, 2009; GULITZ *et al.*, 2011).

Os *Lactobacillus* sp representam a maioria (65-80%) da população microbiana (WOUTERS *et al.*, 2002), enquanto que o *Lactococcus* sp, outras espécies de bactérias e leveduras compõem a porção restante dos microrganismos presentes nos grãos de kefir. Há uma relação simbiótica entre os microrganismos na qual as bactérias e leveduras sobrevivem compartilhando as fontes de energia e fatores de crescimento, e esta associação microbiana é responsável pela fermentação láctica e

alcoólica que ocorre no produto. Foi demonstrado que algumas espécies ocorrerão sempre, independentemente da origem dos grãos (PINTADO *et al.*, 1996; WITTHUHN *et al.*, 2005).

Os microrganismos depois de isolados e identificados receberam a denominação referente ao gênero e espécie, porém alguns dos microrganismos isolados e identificados nas culturas de kefir foram classificados de acordo com o nome do produto, como é o caso do *Kefiri lactobacillus*, *L. kefiranofaciens*, *L. kefirgranum*, *Parakefir lactobacillus* e *Candida kefir*. Além disso, novas espécies têm sido isoladas a partir do kefir, tais como *Saccharomyces turicensis* (WYDER *et al.*, 1999; KWON *et al.*, 2003).

Em grãos de kefir há predominância de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus kefiranofaciens*. No entanto, estas espécies representam apenas 20% dos *Lactobacillus* na bebida final fermentada, sendo o restante constituído por *Lactobacillus kefiri* (80%) (SIMOVA *et al.*, 2002; YUKSEKDAG *et al.*, 2004). As bactérias *Acetobacter acetii* e *A. rasens* também foram isoladas, bem como o fungo *Geotrichum candidum* (PINTADO *et al.*, 1996). Mais de 23 espécies diferentes de leveduras já foram isoladas a partir de grãos de kefir e de bebidas fermentadas de diferentes origens. Contudo, as espécies predominantes são *S. cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Candida kefir*, e *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus* (SIMOVA *et al.*, 2002; WITTHUHN *et al.*, 2004) (TABELAS 1 e 2).

Witthuhn *et al.* (2005), demonstraram em seus estudos que foi possível isolar diferentes microrganismos em vários pontos de tempo durante a fermentação dos grãos de kefir, confirmando a variedade de microrganismos nos grãos e na bebida caracterizando a presença de cepas de bactérias, leveduras e alguns fungos, e também a presença de algumas cepas com ação benéfica a saúde definidas como probióticas.

TABELA 1. CEPAS BACTERIANAS ENCONTRADAS EM KEFIR DE DIFERENTES ORIGENS.

MICROORGANISMOS	ORIGEM	AUTOR
<i>Lactobacillus lactis</i> subsp <i>lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. delbruecki</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> , <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc raffinolactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Streptococcus durans</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Pediococcus acidilactis</i>	Grãos de kefir	SABIR <i>et al.</i> , (2010); SIMOVA <i>et al.</i> , (2002); WITTHUHN <i>et al.</i> , (2005); MAGALHÃES <i>et al.</i> , (2011); KESMEN e KACMAZ (2011); YUKSEKDAG <i>et al.</i> , (2004)
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lb. lactis</i> , <i>Lb. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> , <i>Lb. lactis</i> subsp <i>lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas fluorescences</i>	Kefir tibetano	JIANZHONG <i>et al.</i> , (2009)
<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lb. hordeli</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>lb. Nagelii</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Acetobacter fabarum</i> , <i>Acetobacter orientalis</i>	Kefir da água	GULITZ <i>et al.</i> , (2011)
<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. parabuchneri</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i>	Kefir brasileiro	MAGALHÃES <i>et al.</i> , (2011)

FONTE: O autor, 2014.

O kefir da água é uma bebida fermentada à base de uma solução de sacarose que pode conter diferentes frutas secas e frescas (GULITZ *et al.*, 2011). Sua composição microbiana mostra a presença de BAL, bactérias acéticas e leveduras (NEVE e HELLER, 2002; GULITZ *et al.*, 2011). Gulitz *et al.* (2011), isolaram e identificaram os microrganismos bacterianos do kefir da água como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus hordei*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Acetobacter fabarum* e *Acetobacter orientalis* e as leveduras como *Hanseniaspora valbyensis*, *Lachancea fermentati*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygorulaspora florentina* (TABELAS 1 e 2).

TABELA 2. LEVEDURAS E FUNGOS ENCONTRADOS EM KEFIR DE DIFERENTES ORIGENS.

MICROORGANISMOS	ORIGEM	AUTOR
<i>Zygosaccharomyces</i> sp, <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Cryptococcus humicolus</i> , <i>Saccharomices cerevisiae</i> , <i>Candida humilis</i> , <i>Candida maris</i> , <i>Candida kefir</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Saccharomices unisporus</i> , <i>Galactomyces geotrichum</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	Grãos de kefir	SABIR <i>et al.</i> , (2010); SIMOVA <i>et al.</i> , (2002); WITTHUHN <i>et al.</i> , (2005); MAGALHÃES <i>et al.</i> , (2011); KESMEN e KACMAZ (2011); YUKSEKDAG <i>et al.</i> , (2004)
<i>Kazachstania unispora</i> , <i>Kazachstania exigua</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kluyveromices siamensis</i> , <i>Saccharomices cerevisiae</i> , <i>Saccharomices unisporus</i> , <i>Saccharomices martiniae</i> , <i>Candida humilis</i>	Kefir tibetano	JIANZHONG <i>et al.</i> , (2009)
<i>Hanseniaspora valbyensis</i> , <i>Lachancea fermentati</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Zygotoruspora florentina</i>	Kefir da água	GULITZ <i>et al.</i> , (2011)
<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kazachstania aeróbia</i> , <i>Saccharomices cerevisiae</i> , <i>Lachancea meyersii</i> .	Kefir brasileiro	MAGALHÃES <i>et al.</i> , (2011)

FONTE: O autor, 2014.

### 3. POLISSACARÍDEO

O aumento da procura por polissacarídeos naturais tem sido muito significativo devido à sua utilização na indústria alimentícia, indústria farmacêutica e indústria de cosméticos, como aditivos, bio-absorventes, agentes de remoção de metal, bio-floculantes, agentes de entrega de medicamentos, entre outras funções (De VUYST *et al.*, 2001; WELMAN e MADDOX, 2003; BADEL *et al.*, 2011). Muitos microrganismos, tais como bactérias, fungos e algas têm a capacidade de sintetizar e excretar polissacarídeos extracelulares, e estes polissacarídeos podem ser solúveis ou insolúveis (WANG *et al.*, 2010; BADEL *et al.*, 2011).

Os polissacarídeos que são mais comumente utilizados como aditivos alimentares são xantana, dextrana, gelana, e alginatos. Os exopolissacarídeos (EPS) produzidos pelas BAL também mostram boas características físico-químicas para utilização como aditivos alimentares. Em adição a estas características, os EPSs podem ser obtidos a partir de microrganismos como as bactérias ácido lácticas (WANG *et al.*, 2008; SAIJA *et al.*, 2010; BADEL *et al.*, 2011), classificadas como GRAS (geralmente reconhecidos como seguros).

Muitos estudos demonstraram que a quantidade e as propriedades dos EPSs são dependentes dos microrganismos utilizados no processo de fermentação, as condições de fermentação e a composição dos meios de cultura (KIM *et al.*, 2008; SANTIVARANGKNA *et al.*, 2008; VIJAYENDRA *et al.*, 2008). Geralmente, a produção de EPS em um microrganismo é induzida pela limitação de um nutriente essencial, que não seja o carbono ou outra fonte de energia. E a relação C:N alta tem sido considerada como a condição ambiental mais significativa para a produção de polissacarídeo (NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003).

Alguns EPSs são sintetizados durante todo o crescimento bacteriano, enquanto que outros são produzidos somente durante a fase logarítmica ou na fase estacionária. A síntese de todos esses EPSs é um processo intracelular e utiliza açúcares difosfato nucleotídeos, com polimerização das unidades de monossacarídeos (WELMAN e MADDOX, 2003).

Os polissacarídeos sintetizados por bactérias dividem-se em três grupos: intracelulares, integrantes da parede celular e extracelulares, segundo sua localização na célula bacteriana. A aplicação industrial, de modo geral, está concentrada nos polissacarídeos extracelulares, pois apresentam um processo de

extração e purificação mais simples, além de possibilitarem uma produtividade mais elevada (SILVA *et al.*, 2001).

Os EPSs possuem propriedades reológicas que os tornam adequados como aditivos podendo ser utilizados como estabilizadores, emulsionantes, agentes gelificante e melhoradores da viscosidade. Além disso, alguns EPSs possuem propriedades biológicas, sugerindo a sua utilização como anti-oxidantes, agentes anti-tumorais, agentes anti-microbianos, imunomoduladores entre outras funções (SURESH KUMAR *et al.*, 2008;. PAN e MEI, 2010; PIERMARIA *et al.*, 2010;. BENSMIRA *et al.*, 2010).

As BAL sintetizam EPSs que podem ser homopolissacáridos ou heteropolissacarídeos. Os homopolissacáridos sintetizados são glucanas ou frutanas, que são compostos por um único tipo de monossacárido glicose ou frutose, respectivamente (BADEL *et al.*, 2011), enquanto que os heteropolissacarídeos possuem diferentes tipos de monossacarídeos em proporções diferentes, principalmente de glicose, galactose, ramnose entre outros (DE VUYST e DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO *et al.*, 2002). Os *Lactobacillus* sp podem produzir glucano e frutano, estes homopolissacáridos mostram um desempenho de produção muito superior quando comparados com a produção heteropolissacárido (WELMAN e MADDIX, 2003; BADEL *et al.*, 2011.).

Os heteropolissacarídeos excretados pelos *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus helveticus* contêm galactose, glicose e ramnose como os principais monossacarídeos, mas apresentam outros monossacarídeos em concentrações menores. Eles também são altamente ramificados, com diferentes tipos de ligações, e as denominações são complexas geralmente depende do principal monossacárido (DE VUYST e DEGEEST, 1999; BADEL *et al.*, 2011).

O *Lactobacillus plantarum*, isolado a partir do kefir tibetano sintetiza e excreta EPS classificado como heteropolissacarídeo constituído por galactose, glicose e manose, e estudos com este EPS indicam atividade anti-colesterolêmica (ZHANG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010).

O kefiran é um EPS classificado como um heteropolissacarídeo constituído de glicose e galactose, em concentrações elevadas, e é classificado como um glucogalactano solúvel em água, o que o torna apropriado para ser usado como um aditivo (WANG *et al.*, 2008;. WANG *et al.*, 2010). O kefiran tem excelentes

propriedades reológicas, as quais podem melhorar significativamente a viscosidade de produtos lácteos, favorecendo e mantendo as propriedades do gel (RIMADA e ABRAHAM, 2006). No que diz respeito à atividade biológica do kefiran, vários estudos têm demonstrado que este EPS pode ser usado como um nutracêutico, como descrito na TABELA 3.

TABELA 3. ATIVIDADE BIOLÓGICA DO KEFIRAN

<b>POLISSACARÍDEO</b>	<b>ATIVIDADE BIOLÓGICA</b>	<b>AUTORES</b>
Kefiran	Redução da pressão sanguínea induzida por hipertensão	MAEDA <i>et al.</i> , 2004
	Aumento da atividade fagocitária de macrófagos peritoneais	VINDEROLA <i>et al.</i> , 2006a
	Aumento de IgA peritoneal	DUARTE <i>et al.</i> , 2006
	Atividade anti-tumoral	LIU <i>et al.</i> , 2002
	Atividade anti-microbiana	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2005
	Modulação do sistema imune do intestino e proteção de células epiteliais contra fatores exocelulares de <i>Bacillus cereus</i>	MEDRANO <i>et al.</i> , 2008; PIERMARIA <i>et al.</i> , 2010

FONTE: O autor, 2014.

#### 4. SORO DE LEITE

O leite ocupa lugar de destaque dentre os alimentos de elevado valor nutritivo, e por definição é o produto integral da ordenha ininterrupta de fêmeas leiteiras saudáveis, apresenta composição complexa sujeita a raça, alimentação, idade, tempo de gestação, tempo de ordenha entre outros fatores. O leite apresenta alto valor proteico, presença de aminoácidos essenciais, carboidratos, lipídios, vitaminas lipossolúveis e vitaminas do complexo B, bem como alguns minerais (FENEMA, *et al.*, 2010; MARQUES, *et al.*, 2005).

O setor produtivo de leite no Brasil é uma das maiores cadeia alimentares brasileira que se encontra em plena expansão, com uma produção de 35 bilhões de litros em 2013 um aumento de 8,36% em relação à produção de 2012 que foi de 32,3 bilhões de litros de leite, sendo possível observar um crescimento em média de 4,3% ao ano (FIGURA 2) (IBGE, 2014).

O Brasil ocupa o sexto lugar na produção de leite no mercado global, ficando atrás da União Européia, Estados Unidos, Índia, China e Rússia (USDA, 2014). Entre os estados brasileiros, o Paraná foi o terceiro maior produtor com uma produção de aproximadamente 680 milhões de litros de leite em 2013, ficando atrás de Minas Gerais e Rio Grande do Sul. O leite no estado *in natura* e em pó representou um faturamento superior a U\$ 55 bilhões em 2013 (IBGE, 2014).

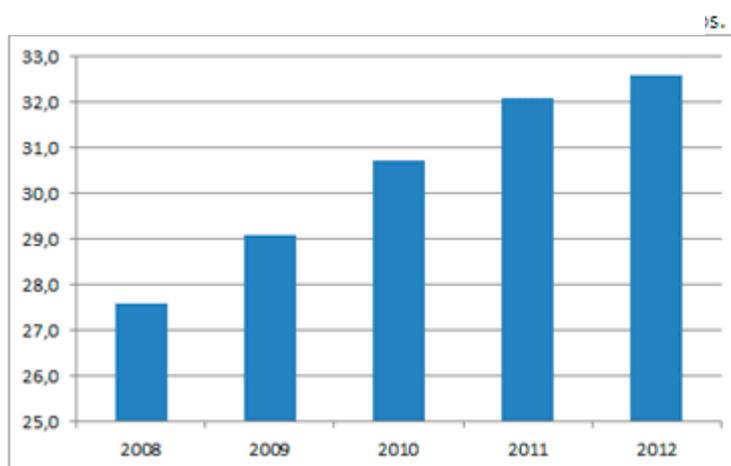


FIGURA 2. PRODUÇÃO BRASILEIRA DE LEITE DESDE 2008 EM BILHÕES DE TONELADAS.

FONTE: IBGE, 2014 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística).

A partir do leite é possível obter o leite pasteurizado, o qual é consumido mundialmente e é possível utilizá-lo como matéria prima para produzir um grande número de derivados como bebidas lácteas fermentadas e não fermentadas, queijos, cremes, manteiga, sobremesas geladas, entre outros.

O soro de leite faz parte da cadeia produtiva de leite, sendo considerado um subproduto da produção de queijo como demonstrado na FIGURA 3 e também pode ser obtido a partir do processo de produção de caseína. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (Abiq), o Brasil produz cerca de 850 mil toneladas de queijo por ano, e estima-se que, em média para cada quilo de queijo produzido são gerados oito litros de soro (ABIQ, 2014).

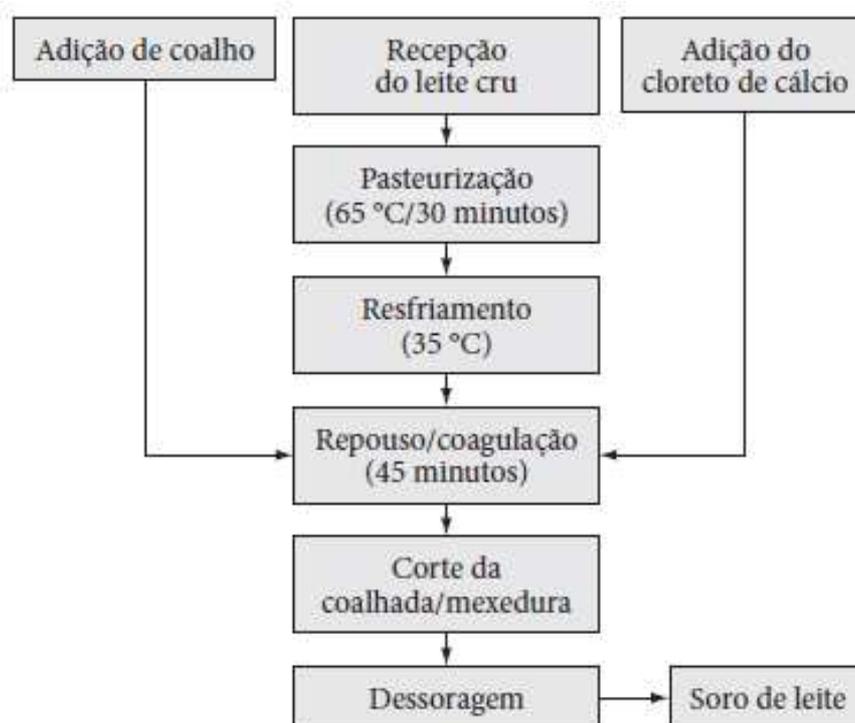


FIGURA 3. FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DO SORO DE LEITE A PARTIR DA PRODUÇÃO DE QUEIJO.  
FONTE: LIRA *et al.*, 2009.

O soro de leite tem valor nutritivo considerável, pois contém em sua composição carboidratos como a lactose; proteínas como lactoalbumina, lactoglobulina; aminoácidos essenciais; minerais e vitaminas do grupo B (SILVA, *et al.*, 2011). O soro de leite pode ser classificado de acordo como o seu grau de acidez em soro doce, soro com acidez média e soro ácido. O soro doce apresenta acidez titulável de 0,10% a 0,20% e pH de 5,8 a 6,6; o soro com acidez média 0,20%

a 0,40% e pH de 5,0 a 5,8 e para o soro ácido a acidez titulável é superior a 0,40% e pH inferior a 5,0 (FENEMA, *et al.*, 2010).

Atualmente o soro de leite obtido a partir da produção de queijo é utilizado como ingrediente em vários produtos como bebidas lácteas fermentadas, bolachas, pães, doces, sucos, bebidas fortificadas e também comercializado como suplemento alimentar. Uma parte do soro pode ser utilizada na alimentação animal, mas a maioria do soro é tratado e descartado como resíduo. Conforme Machado *et al.*, (2000), o soro de leite, advindo da produção de queijo, é visto como agente de poluição, pois sua descarga em cursos de água pode provocar a destruição da flora e fauna devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que é cerca de 30000 a 50000 mg . L<sup>-1</sup>. Este índice é aproximadamente 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico. Para cada tonelada de soro que não passa por processo de tratamento e é despejado por dia em efluentes, é equivalente, em média, à poluição diária de aproximadamente 450 pessoas (GIROTO e PAWLOWSKY, 2002).

É observado um aumento nas exigências legais em relação ao tratamento ou reaproveitamento do soro por parte das indústrias de laticínios, e mesmo assim acredita-se que aproximadamente 50% de todo o soro líquido produzido não é aproveitado, sendo este número ainda maior se forem consideradas as micro e pequenas empresas (BEM-HASSAN; GHALY, 1994; LIRA *et al.*, 2009). Visto que este subproduto tem baixos custos e devido ao seu grande volume e capacidade poluidora, é extremamente necessário desenvolver alternativas tecnológicas para o seu adequado aproveitamento.

## 5. ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 5.1 ATIVIDADE ANGIOGÊNICA

O corpo do ser humano é extremamente complexo e para a manutenção da vida é necessária regulação adequada, o que requer um transporte eficiente e simultâneo de gases, líquidos, nutrientes, moléculas sinalizadoras e células circulantes entre os tecidos e órgãos, bem como a remoção de resíduos dos órgãos e dos tecidos. Esta função de transporte é realizada por dois sistemas de vasos: os vasos sanguíneos e os vasos linfáticos formando uma rede, composta por células endoteliais. Estes dois vasos são essenciais para a homeostase do organismo saudável, bem como podem contribuir para a malformação ou para a disfunção resultando na patogênese de muitas doenças (CARMELIET, 2003; ALITALO, *et al.*, 2005).

#### 5.1.1 Formação de neovasos

De acordo com Lamalice, *et al.*, 2007, o início da formação de vasos sanguíneos ocorre com o surgimento das células endoteliais a partir da diferenciação de células mesodérmicas em hemangioblastos, com a formação das primeiras redes vasculares, denominadas de ilhotas sanguíneas (FIGURA 4). Os vasos sanguíneos são um dos primeiros sistemas formados durante a fase embrionária a partir do mesoderma (camada germinativa intermediária do embrião) e estão em contato direto com o sangue. São constituídos por uma monocamada de células endoteliais revestidas por moléculas de colágeno, laminina, elastinas, glicoproteínas (fibronectina) na matriz extracelular, células com função de suporte e dependendo da localização do vaso no organismo, sua estrutura física e seus constituintes diferem quanto a fenótipo, composição e função (GILBERT, 2000; DIAS *et al.*, 2002).

Em geral nos indivíduos adultos saudáveis, as células endoteliais que revestem o lúmen dos vasos sanguíneos encontram-se quiescentes, apresentam atividade mitogênica próxima de zero, e a neoformação vascular é virtualmente ausente. Porém, quando estas células são estimuladas tem-se início a neoformação

vascular. A neoformação vascular ocorre por dois mecanismos distintos: a vasculogênese e a angiogênese (FIGURA 4) (LAMALICE *et al.*, 2007; ADANS e ALITALO, 2007).

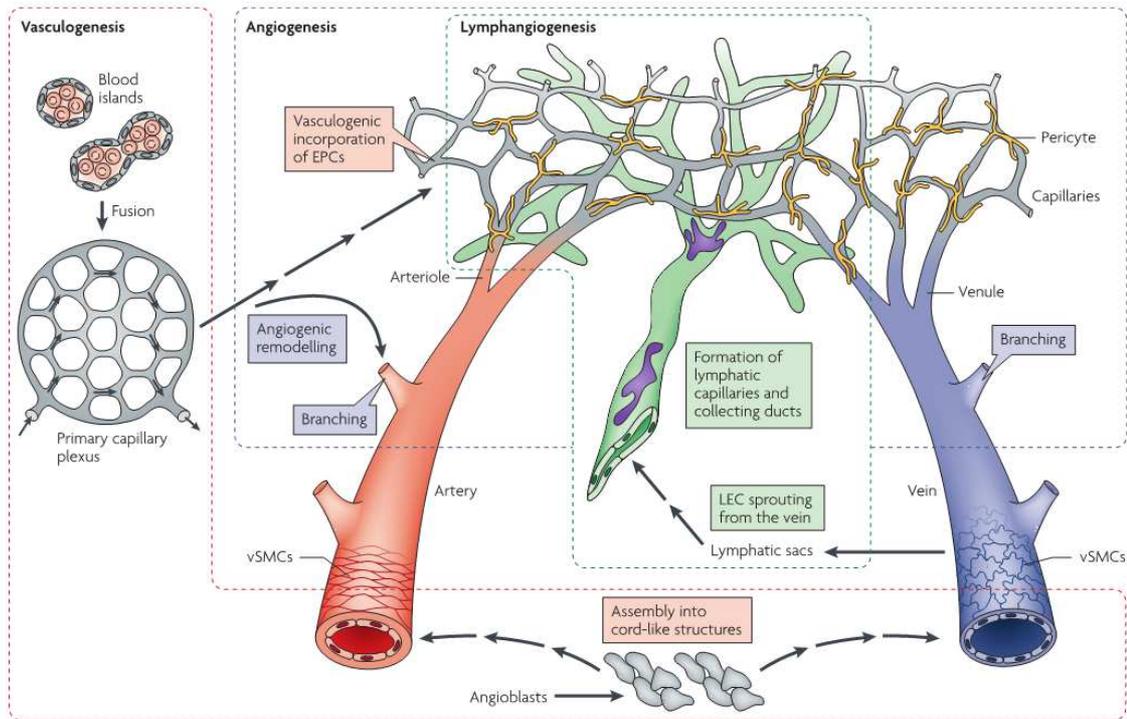


FIGURA 4: VASCULOGÊNESE E ANGIOGÊNESE.

Fonte: ADANS e ALITALO, 2007.

As células no embrião diferenciam-se em células precursoras endoteliais (EPC), angioblastos e formam agregados, conhecidos como ilhas de sangue (à esquerda). A fusão de ilhas de sangue conduz à formação vasculogênica de plexos capilares primários em forma de favo de mel no saco vitelino e do próprio embrião. A circulação sanguínea é estabelecida e os plexos principais são remodelados em uma rede hierarquizada de arteríolas e artérias (vermelho), capilares, cinza, e vênulas e veias (azuis). As células de músculo liso vascular são associados com as artérias e as veias, enquanto que os capilares são cobertos por pericitos (amarelo).

A vasculogênese implica na formação de vasos sanguíneos diretamente de células precursoras de angioblastos, logo em seguida surgem as células endoteliais que se organizam em agregados celulares, denominados de ilhotas sanguíneas primitivas e nestas ilhotas ocorre o estabelecimento do plexo vascular primordial (DIAS *et al.*, 2002; BOUIS *et al.*, 2006). A angiogênese é a formação de uma nova vasculatura a partir de vasos preexistentes, tais como vênulas e capilares, isto acontece por brotamento ou intussuscepção (divisão de vasos por meio de prolongamento da parede vascular) (DIAS *et al.*, 2002; ADANS e ALITALO, 2007).

No embrião, a vasculogênese é responsável pelo desenvolvimento dos grandes vasos e do coração, já angiogênese promove a invasão de novos vasos sanguíneos propiciando o desenvolvimento de órgãos como o fígado, os pulmões e o cérebro (ZAMMARETTIA e ZISCH, 2005). A angiogênese é fundamental para o reparo e o desenvolvimento de tecidos, como na cicatrização, desenvolvimento da circulação colateral em tecidos isquêmicos, na formação de corpo lúteo, endométrio, placenta e crescimento de cabelo, nestes casos a angiogênese é denominada fisiológica e é rigidamente controlada e transitória. Entretanto podem ocorrer condições patológicas como artrite reumatóide, hemangiomas, tumores sólidos e retinopatia diabética, nos quais a atividade angiogênica contribui para a sustentação e o agravamento dessas condições, pois, nestes casos é um processo duradouro e desregulado (FOLKMAN, 1987; DIAS *et al.*, 2002; ADANS e ALITALO, 2007).

A angiogênese como um mecanismo biológico apresenta uma variedade de controles para prevenir o crescimento capilar abrupto. As células endoteliais e os pequenos capilares carregam a informação genética para a formação da rede capilar, e moléculas angiogênicas específicas iniciam o processo, enquanto que moléculas inibidoras o previnem (FOLKMAN, 2003).

O início da angiogênese ocorre com a presença de estímulo como hipóxia, alterações isquêmicas, liberação de citocinas e liberação de fatores de crescimento. A primeira etapa do processo consiste em ativação das células endoteliais dos vasos sanguíneos preexistentes e logo em seguida elas degradam a membrana basal adjacente. As células endoteliais livres migram para a membrana basal degradada, este processo de invasão e migração requer uma atividade cooperativa de proteases com serina. As células epiteliais, células do sistema imunológico e os fibroblastos também auxiliam na degradação da membrana basal (LAMALICE *et al.*, 2007; ADANS e ALITALO, 2007; HODIVALA-DILKE, 2008).

Na segunda etapa tem-se a proliferação das células endoteliais e a formação do broto capilar (FIGURA 5), sendo mediada por vários fatores de crescimento. A fase final inclui a formação e alças capilares e a determinação da polaridade das células endoteliais para a formação do lúmen capilar e para as interações célula-célula e célula-matriz. A estabilização do vaso sanguíneo neoformado é atingida após a migração de células mesenquimais para o redor dos neovasos e sua posterior diferenciação em pericitos ou células musculares lisas (DIAS *et al.*, 2002; FOLKMAN, 2003).

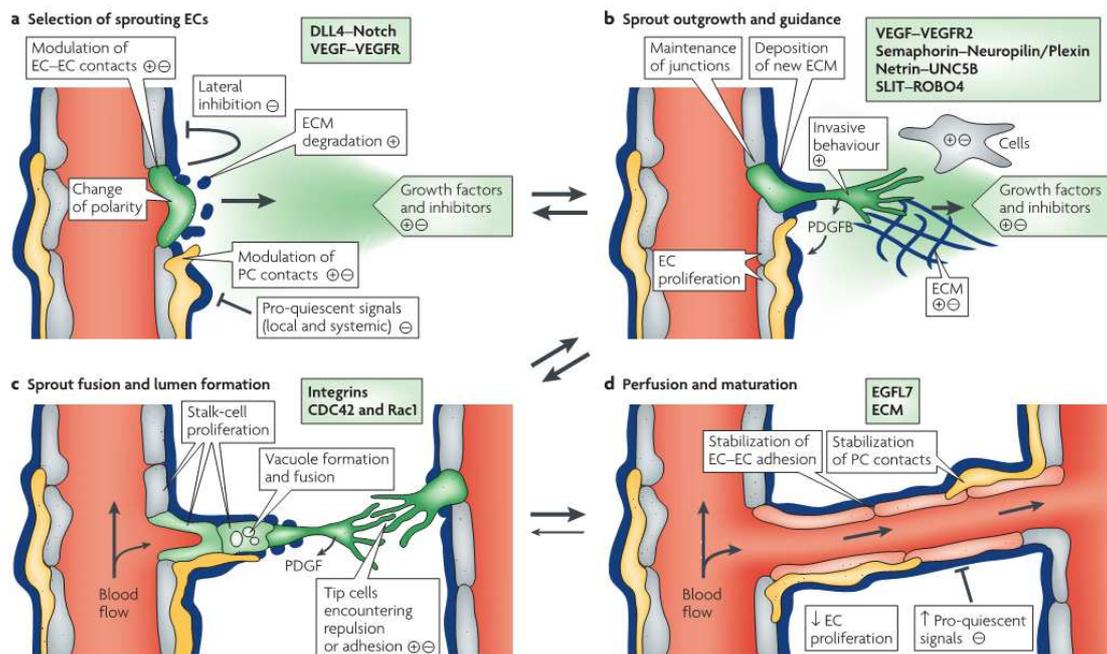


FIGURA 5. FORMAÇÃO DE NOVOS VASOS.

FONTE: Adaptado de ADANS e ALITALO, 2007.

a) A formação de novos vasos é controlada pelo equilíbrio entre os sinais pró-angiogênicos (+), como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e fatores que promovem quiéscentia (-). b) Tem-se ativação das células endoteliais (EC) em condições que favorecem a angiogênese, promovendo o brotamento de algumas células endoteliais (verde), enquanto outros não respondem (cinza). O crescimento do broto formado por EC é guiado por gradiente de VEGF. Tem-se o lançamento de fatores de crescimento de plaquetas B (PDGF). c) As junções EC-EC devem ser mantidas após a formação do lúmen. A formação do lúmen na haste EC envolve a fusão dos vacúolos, mas outros mecanismos também podem contribuir. d) O fluxo de sangue aumenta a oferta de oxigênio e, assim, reduz os sinais pró-angiogênicos que são induzidas por hipóxia. A perfusão promove os processos de maturação, com a estabilização das junções celulares e deposição de matriz.

### 5.1.2 Fatores que controlam a formação de neovasos

A formação de neovasos é mediada por vários fatores, em geral são moléculas específicas para induzir e controlar o processo, denominadas de fatores angiogênicos os quais possuem atividade regulatória positiva e os fatores antiangiogênicos com atividade negativa (FIGURA 5). O equilíbrio entre a produção destas substâncias pró e antiangiogênicas pode ser rompido por fatores químicos e físicos (lesão tissular, hipóxia, liberação de citocinas) ou mecânicos (alterações do fluxo sanguíneo e do formato celular) (DIAS *et al.*, 2002; FOLKMAN, 2003; LAMALICE *et al.*, 2007).

Os indutores da angiogênese podem ser subdivididos em 3 classes, dependendo da atividade que exercem. A primeira classe consiste na família do VEGF (fator de crescimento vascular), incluem os cinco fatores de crescimento derivados da placenta: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E. A forma mais ativa e abundante em humanos é o monômero de VEGF-A denominado de VEGF, este fator é responsável por regular as funções nas células endoteliais, é um potente indutor da angiogênese atuando na diferenciação, proliferação e migração celular como demonstrado na FIGURA 5 e é necessário o equilíbrio entre os VEGs para que o processo aconteça de maneira completa e efetiva (ADANS e ALITALO, 2007; LAMALICE *et al.*, 2007). Nesta classe também se encontram as Ang (angiopoetinas) e FGF (fator de crescimento de fibroblastos), que atuam de maneira parácrina induzindo a angiogênese (DIAS *et al.*, 2002).

A segunda etapa contém moléculas incluindo as citocinas, quimiocinas e enzimas, as quais atuam diretamente na angiogênese ativando várias células-alvo próximo às células endoteliais. A terceira etapa envolve fatores de ação indireta, cujo efeito angiogênico é resultante da liberação de fatores angiogênicos por macrófagos (interleucinas e prostaglandinas) e células endoteliais (ADANS e ALITALO, 2007; AIRES, 2013).

### 5.1.3 Fatores angiogênicos estimuladores e inibidores e seu mecanismo de ação

A capacidade para iniciar a cascata angiogênica está presente em todos os tecidos, uma vez que múltiplos fatores mantêm o equilíbrio entre os estimuladores e inibidores da angiogênese na maioria dos tecidos. No desenvolvimento e na organização de uma nova rede vascular, fatores endógenos estão envolvidos promovendo a ativação, proliferação, migração e organização das estruturas que compõem os vasos sanguíneos (FOLKMAN, 2003; ADANS e ALITALO, 2007; HODIVALA-DILKE, 2008; AIRES, 2013).

As células endoteliais vão responder aos fatores angiogênicos por meio de mensageiros intracelulares como: cálcio, proteinoquinases, adenilciclase e monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (AIRES, 2013). A presença de receptores nas membranas das células endoteliais presentes nos vasos sanguíneos e pelas células endoteliais linfáticas favorece a recepção da informação para o início ou

interrupção da angiogênese. Além de apresentarem receptores de Ang e os receptores para os VEGFs desempenham papel importante em relação à enzima tirosina quinase e o controle rigoroso do processo angiogênico (FIGURA 6) (DIAS *et al.*, 2002; SIEKMANN e LAWSON, 2007).

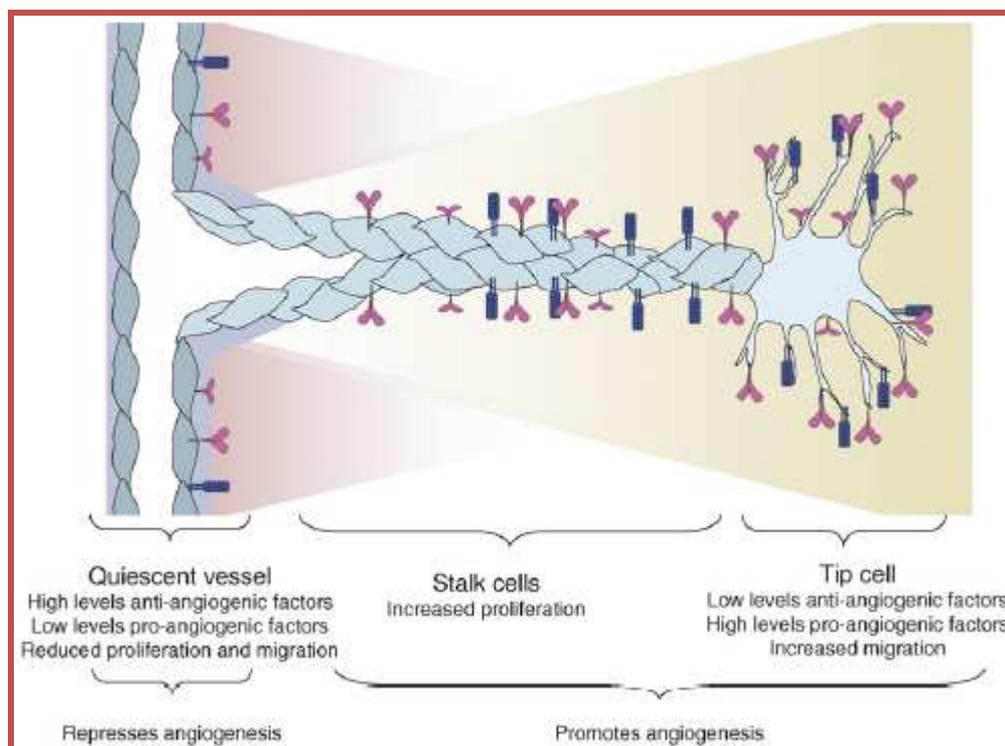


FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO DOS RECEPTORES PARA PROMOTORES E INIBIDORES DA ANGIOGÊNESE.

FONTE: HODIVALA-DILKE, 2008.

Representação esquemática da regulação angiogênica. Neste modelo observam-se os receptores em vasos quiescentes em menor número e a medida que ocorre angiogênese o número de receptores aumentam. Também ocorre um equilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos para determinar a angiogênese fisiológica.

Devido à importância fisiológica e patológica da angiogênese e o desenvolvimento de várias técnicas que permitem estudos diretos e indiretos da formação de novos vasos sanguíneos, a atividade angiogênica de substâncias estimuladoras ou inibidoras do processo é descrita como potencial agente terapêutico (AIRES, 2013). Existem inúmeras substâncias já conhecidas que possuem ação pró-angiogênica e anti-angiogênica como demonstrado na TABELA 4.

TABELA 4. RELAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRÓ-ANGIOGÊNESE E ANTI-ANGIOGÊNESE.

SUBSTÂNCIAS PRÓ-ANGIOGÊNICAS	SUBSTÂNCIAS ANTI-ANGIOGÊNICAS
HIF	Angiostatina
VEGF	CD59
Ang	Endostatina
MMP	Fibronectina
Avb3	Heparina
FGF	hCG
G-CSF	Interferon a, b, g
HGF	IL-12
IL-8	Retinóides
PDGF	Corticóides
TGF	TSP
TNF $\alpha$	Troponina
PGF	

FONTE: O autor, 2014.

#### 5.1.4 Modelo experimental *in vivo* da angiogênese

Para os estudos de eficácia de substâncias pró e anti angiogênicas vários modelos *in vivo* e *in vitro* foram estabelecidos como os ensaios de neovascularização da córnea, ensaio *in vivo* e *in vitro* da membrana corioalantóica de embriões de galinha (*Gallus gallus*) denominada de CAM - assay (corioalantoic membrane assay), uso de implantes de esponjas contendo células ou substâncias a serem testados, testes em vasos axilares de zebrafish e na membrana do saco vitelínico de embriões e de indivíduos adultos de camundongos (AUERBACH *et al.*, 2003; BYRD e GRABEL, 2004).

De acordo com Campestrini, 2007, o uso da técnica CAM – assay para o estudo da angiogênese é extremamente vantajoso quando comparado com outras técnicas, porque se utiliza material de baixo custo, facilidade na execução e permite realizar um número racional de amostras com confiabilidade.

A membrana corioalantóica embrionária de galinha é uma membrana extra-embrionária formada por uma fusão da mesoderme com a ectoderme coriônica, que se encontra abaixo da membrana da casca (HAMILTON, 1965). O processo de

vascularização tem início com a vasculogênese com a formação primitiva de ilhotas sanguíneas, as quais passam por um processo de associação (anastomose) com o aparecimento de uma estrutura capilar. Após 48 horas de incubação é possível observar a formação do plexo vascular e em seguida a formação do coração que estabelece uma circulação sanguínea com as artérias e veias (FIGURA 7) (HAMBURGER e HAMINTON, 1951).



FIGURA 7. FOTOGRAFIA DE UM EMBRIÃO COM 48 HORAS DE INCUBAÇÃO EM INCUBADORA A 36,5°C

FONTE: O autor, 2014.

Na ponta da seta as primeiras redes capilares e a formação do coração.

A angiogênese microvascular promove a expansão progressiva desta rede capilar com o intuito de atender às exigências de oxigênio do embrião e promover todo o metabolismo. A expansão da microcirculação é caracterizada pela proliferação de células endoteliais, o que resulta em uma rede de capilar espessa e formando uma superfície contínua e em contato com a casca. Ocorre um aumento na taxa de angiogênese na membrana após o décimo dia de incubação do embrião, essa estrutura extraembrionária é caracterizada por ser uma vesícula de forma achatada, altamente vascularizada e que se dispõe sobre o saco vitelínico e o embrião. O sistema vascular do embrião de galinha atinge a sua disposição final ao décimo oitavo dia (PATTEN, 1951; MISSIRLIS *et al.*, 1990).

## 5.2 ATIVIDADE INIBIDORA DA ENZIMA HIALURONIDASE NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação ou processo inflamatório é uma reação do organismo a uma lesão de tecido ou infecção, com o envolvimento de células conjuntivas, células do sangue e células do plasma, e dependendo da intensidade da lesão pode ocorrer o envolvimento sistêmico. Em geral é um mecanismo de defesa, mas pode ela própria ser uma doença ou às vezes ter efeitos clínicos indesejáveis como no caso das doenças autoimunes, artrite reumatóide entre outras (DELVES *et al.*, 2011).

Quando ocorre lesão na pele, imediatamente se inicia o processo de reparação tecidual ou conhecido como cicatrização, este processo é dinâmico, contínuo e complexo, pois envolve uma série de eventos mediados por substâncias moleculares e celulares que muitas vezes se confundem ao longo das fases que compõem o processo. A inflamação, proliferação celular e remodelagem dos tecidos são fases, nas quais ocorrem síntese e degradação da matriz extracelular (DELVES *et al.*, 2011). O ácido hialurônico é uma glicosaminoglicana não sulfatada da matriz extracelular e desempenha funções biológicas distintas no processo de restabelecimento da integridade da pele lesada. A degradação do ácido hialurônico é de responsabilidade da enzima hialuronidase, uma glicoproteína que atua sobre a matriz extracelular alterando sua composição e estrutura (FRASER *et al.*, 1997; NOBLE, 2002; STERN, 2004).

### 5.2.1 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico é uma glicosaminoglicana (polissacarídeo) não sulfatada de alto peso molecular e linear, formado por dissacarídeos polianiónicos de ácido D - glicurônico e N - acetilglicosamina como demonstrado na FIGURA 8 e é o principal componente da matriz extracelular, também pode ser encontrado na forma do sal hialuronato de sódio formado em pH fisiológico (LAURENT e FRASER, 1992; FRASER *et al.*, 1997).

De acordo com Noble, 2002, o ácido hialurônico encontrado na maioria dos tecidos, é responsável pela manutenção e integridade estrutural dos tecidos quando

em homeostase, porém em condições de estresse ou patogênia sofre despolimerização fragilizando a matriz extracelular.

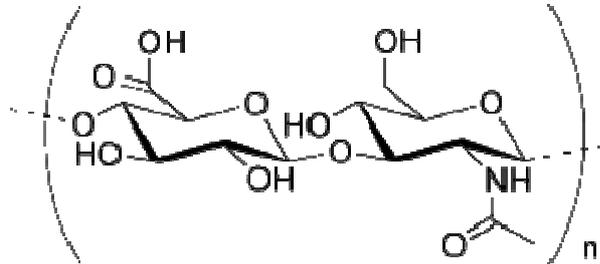


FIGURA 8. ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO HIALURÔNICO.  
FONTE: BOERIU *et al.*, 2013.

Num indivíduo de 70 kg é encontrado aproximadamente 15 g de ácido hialurônico e quase um terço é renovado diariamente para manter a matriz extracelular. No processo de renovação a enzima hialuronidase é responsável por promover a degradação do ácido hialurônico. A velocidade de renovação do ácido hialurônico depende do tipo de tecido em que ele se encontra, por exemplo, na pele onde a concentração é maior a meia-vida é de um dia (STERN, 2004). O controle na renovação do ácido hialurônico é rigorosamente controlado, pois a ação exacerbada da hialuronidase pode resultar na desestabilização da matriz.

Em tecidos especializados como cordas vocais, fluido sinovial, cordão umbilical e cartilagem o ácido hialurônico apresenta funções diferenciadas como manter a viscosidade, absorção de impactos, cicatrização de ferimentos e preenchimento de espaço (KOGAN *et al.*, 2007).

### 5.2.2 Enzima hialuronidase

As hialuronidases são um grupo de enzimas que predominantemente promovem a degradação do ácido hialurônico, aumentando assim a permeabilidade de tecidos conjuntivos, promovendo significativamente a diminuição da viscosidade e facilitando a proliferação celular entre os tecidos resultando na degradação da matriz extracelular favorecendo a expansão de processos inflamatórios, e também decresce a viscosidade dos fluidos corporais (MADIGAN *et al.*, 1997).

Meyer, 1971, em seu estudo classificou a hialuronidase em três grupos baseado na análise bioquímica dos produtos finais gerados: hialuronidase EC 3.2.1.35 é a hialuronoglicosaminidase que tem como produto principal o tetrasacarídeo, hialuronidase EC 3.2.1.36 é a hialuronoglicuronidase que tem como produto principal o tetrasacarídeo ou o hexasacarídeo e a hialuronidase EC 4.2.2.1 é a hialuronato liase produzida por bactérias.

As hialuronidases também são classificadas de acordo com o seu comportamento e atividade em diferentes pHs em dois grupos: as hialuronidases com atividade em ambiente ácido, pH entre 3 e 4 como as enzimas séricas e do fígado e as hialuronidases ativas em ambientes neutros, com pH entre 5 e 8 são enzimas encontradas no esperma de mamíferos, veneno de abelhas e veneno de serpentes (STERN, 2004; KEMPARAJU *et al.*, 2005; GIRISH, 2006).

De acordo com Bornstein e Sage (2002), a degradação da matriz extracelular é um evento essencial em muitos processos fisiológicos como o desenvolvimento embrionário, crescimento e reparo dos tecidos, entretanto, quando ocorre um descontrole principalmente da enzima hialuronidase, podem se instalar condições patológicas como artrite reumatóide, osteoartrite, doenças autoimunes e alterações estruturais na derme.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. H.; ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews**, v. 8, p. 464-478, 2007.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013.
- ALITALO, K.; TAMMELA, T.; PETROVA, T. V. Lymphangiogenesis in development and human disease. **Nature**, v. 438, p. 946–953, 2005.
- ANGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). **Journal Dairy Res**, v.60, p. 263–267, 1993.
- AUERBACH, R.; LEWIS, R.; SHINNERS, B.; KUBAI, L.; AKHTAR, N. Angiogenesis Assays: A Critical Overview. **Clinical Chemistry**, v. 49, p. 32–40, 2003.
- BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspective for Lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 54-66, 2011.
- BEM-HASSAN, R. M.; GHALY, A. E. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, p. 89-105, 1994.
- BENSMIRA, M.; NSABIMANA, C.; JIANG, B. Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1180–1184, 2010.
- BYRD, N.; GRABEL, L. Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 14, n. 8, p. 308-313, 2004.
- BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opin. Cell. Biol**, v. 14, n. 3, p. 608- 616, 2002.
- BOERIU, C. D.; SPRINGER, J.; KOOY, F. K.; LAMBERTUS, A. M.; BROEK, V. D.; EGGINK, G. Production methods for hyaluronan. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2013, Article ID 624967, 14 p., 2013. doi:10.1155/2013/624967.
- CAMPESTRINI, L.H. **Aloe barbadensis Miller**: Análise do perfil metabólico e estudos dos efeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana. Florianópolis, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UFSC, 2007.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, p. 653–660, 2003.
- CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**. v. 100, 43-53.

DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. **Roitt's essential immunology**. 12. ed. Oxford, UK: Wiley Black Well, 560 p., 2011.

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 153-177, 1999.

DE VUYST, L.; DE VIN, F.; KAMERLING, J.P. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 687-707, 2001

DIAS, P.F.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; MARASCHIM, R.P.; MARASCHIM, M. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 25, p. 28-34, 2002.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, p. 442-447, 1987.

FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. **Curr. Mol. Med.**, v. 3, p. 643-651, 2003.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. Kefir: a fermented milk product. *In*: FARNWORTH, E.R. (Ed.). **Handbook of Fermented Functional Foods**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003. p. 77-112.

FENNEMA, O. R., DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. 4. ed. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Atmed, 2010.

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, p. 762-767, 2006.

FRASER, J.; LAURENT, T.; LAURENT, U. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal of Internal Medicine**, v. 242, p. 27-33, 1997.

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

GILBERT, M. M.; SMITH, J.; ROSKAMS, A. J. e AUD, V. J. Neuroigin 3 is expressed in a wide range of glia during development. **Developmental Biology**, v. 222, p. 256-256, 2000.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. Soro de leite: custos de equipamentos para seu processamento. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v.57, n.327, p.117-121, 2002.

GORSEK, A.; TRAMSEK, M. Kefir grains production—An approach for volume optimization of two-stage bioreactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 153-158, 2008.

GULITZ, A.; STADIE, J.; WENNING, M.; EHRMANN, M.; VOGEL, R. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 284–288, 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K.; TA, T. Determination of antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids. **Int. J. Dairy Technol**, v. 59, p. 209–215, 2006.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **J. Morphol**, v. 88, p. 49-92, 1951.

HAMILTON, H. L. **Lillie's Development of the Chick**. 3rd edn. Rinehart and Winston, N Y: Holt, 1965.

HODIVALA-DILKE, K. Alpha v beta 3 integrin and angiogenesis: a moody integrin in a changing environment. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 20, n.5, p. 514-519, 2008.

JIANZHONG, Z.; XIAOLI, L.; HANHU, J.; MINGSHENG, D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26, p. 770–775, 2009.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K.S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic KHANUM, S.A.; MURARI, S.K.; VISHWANATH, B.S.; SHASHIKANTH, S. Synthesis of benzoyl phenyl benzoates as effective inhibitors for phospholipase A2 and hyaluronidase enzymes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.4100–4104, 2005.

KESMEN, Z.; KACMAZ, N. Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 276–283, 2011.

KIM, Y.; KIM, J. U.; OH, S.; KIM, Y. J.; KIM, M.; KIM, S. H. Technical optimization of culture conditions for the production of exopolysaccharide (EPS) by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. **Food Science and Biotechnology**, v. 17, p. 587–593, 2008.

KOGAN, G.; SOLTES, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial application. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 17-25, 2007.

KUO, C. Y.; LIN, C. W. Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, p. 19–23, 1999.

KWON, C. S.; PARK, M. Y.; CHO, J. S.; CHOI, S. T.; CHANG, D. S. Identification of effective microorganisms from kefir fermented milk. **Food Science Biotechnol**, v. 12, p. 476-479, 2003.

LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. **Circ. Res.** v. 100, p. 782-794, 2007.

LAURENT, T. C.; FRASER, J. R. E. Hyaluronan. **Faseb Journal.** v. 6, p. 2397-2404, 1992.

LIRA, H. L.; SILVA, M. C. D.; VASCONCELOS, M. R. S.; LIRA, H. L.; LOPEZ, A. M. Q. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p 33-37, 2009.

MACHADO, R. M. G.; FREIRE, V. H.; SILVA, P. C. Alternativas tecnológicas para o controle ambiental em pequenas e médias indústrias de laticínios. *In*: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 27, 2000. **Anais.** Porto Alegre, 2000.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock, biology of microorganisms, 8. ed. Rio de Janeiro: Prentice Hall do Brasil. 521 p., 1997.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 693–702, 2011.

MARQUES, M. S.; COELHO JUNIOR, L. B.; SOARES, P. C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo “C” processado no estado de Goiás. *In*: Congresso Latino-Americano 7.; Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2., Búzios. **Anais.** Búzios, 2005. v.19, n.130, 2005.

MCCUE, P. P.; SHETTY, K. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1791–1997, 2005.

MEYER, K. Hyaluronidases. *In*: BOYER, P.D. (Ed.). **The Enzymes.** New York: Academic Press, 1971. p. 307–320.

MISSIRLIS, E.; KARAKULAKIS, G.; MARAGOUDAKIS, M. E. Angiogenesis is associated with collagenous protein synthesis and degradation in the chick chorioallantoic membrane. **Tissue Cell.** v. 22, p. 419-426, 1990.

NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry.** v. 38, p. 1513-1519, 2003.

NEVE, H.; HELLER, K.J. The microflora of water kefir: a glance by scanning electron microscopy. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 54, p. 337–349, 2002.

NOBLE, P. W. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. **Matrix Biology.** v. 21, p. 25-29, 2002.

PAN D.; MEI X. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 908-914, 2010.

PAPAVASILIOU, G.; KOURKOUTAS, Y.; RAPTI, A.; SIPSAS, V.; SOUPIONI, M.; KOUTINAS, A. A. Production of freeze-dried kefir culture using whey. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 247–254, 2008.

PATTEN, B.M. **Early Embryology of the Chick**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 1951.

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

PIERMARIA J.; BOSCH A.; PINOTTI A.; YANTORNO O.; GARCIA M. A.; ABRAHAM, A. G. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1261-1269, 2010.

PINTADO, M. E.; LOPES DA SILVA, J. A.; FERNANDES, P. B.; MALCATA, F. X.; HOGG, T. A. Microbiological and rheological studies on Portuguese Kefir grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 15-26, 1996.

REA, M. C.; LENNARTSSON, T.; DILLON, P.; DRINAN, F. C.; REVILLE, W. J.; HEAPES, M.; COGAN, T. M. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 83–94, 1996.

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

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**. v. 12, p. 163–171. 2002.

SABIR, F.; BEYATLI, Y.; COKMUS, C.; ONAL-DARILMAZ, D. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. **Journal of Food Science**. v.75, p. 568–573, 2010.

SAIJA, N.; WELMAN, A.; BENNETT, R. Development of a dairy- based exopolysaccharide bioingredient. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 603-608, 2010.

SALOFF-COSTE, C.J. Kefir. Nutritional and health benefits of yoghurt and fermented milks. **Dannone World Newsletter**, v. 11, p. 1–7, 1996.

SANTIVARANGKN A,C.; HIGL, B.; FOERST, P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. **Food Microbiology**, v. 25, p. 429–441, 2008.

SILVA, C. A.; GOMES, J. P.; SILVA, F. L. H.; MELO, E. S. L. R.; CALDAS, M. C. S. Utilização de soro de leite na elaboração de pães: estudo da qualidade sensorial. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, p. 355-362, 2011.

SERAFINI, F.; TURRONI, P.; RUAS-MADIEDO, G. A.; LUGLI, C.; MILANI, S.; DURANTI, N.; ZAMBONI, F.; BOTTACINI, D.; VAN SINDEREN, A.; MARGOLLES, M. Kefir fermented milk and kefiran promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. **Int. J. Food Microbiol.**, doi 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.024 (accepted article), 2014.

SIEKMANN, A. F.; LAWSON, N. D. Notch signaling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. **Nature**. v. 445, p. 781–784, 2007.

SILVA, F. R.; VETTORE, A. L.; KEMPER, E. L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidium gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 203, p. 165-171, 2001.

SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, T. S.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, p. 1–6, 2002.

STERN, R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, p.317–325, 2004.

ST-ONGE, FARNWORTH, E. R.; SAVARD, T.; CHABOT, D.; MAFU, A.; JONES, P. J. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. **BMC Complement. Altern. Med**, v. 2, p. 1–7, 2002.

SURESH KUMAR, A.; MODY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 103-117, 2008.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Dairy**: World Markets and Trade. April 2012. Disponível em: <<http://usda01.library.cornell.edu/usda/fas/dairy-market//2010s/2014/dairy-market-12-14-2012.pdf>>. Acesso em: 08/04/2014.

VIJAYENDRA, S. V. N.; PALANIVEL, G.; MAHADEVAMMA, S.; THARANATHAN, R. N. Physico-chemical characterization of an exopolysaccharide produced by a nonropy strain of *Leuconostoc sp* CFR 2181 isolated from dahi, an **Indian Traditional Lactic Fermented Milk Product**. v. 72, p. 300–307, 2008.

XIAO, L. L.; DONG, M. S. Screening and cholesterol-degrading activity of *Lactobacillus casei* KM-16. **China Dairy Industry**, v. 31, p. 7–10, 2003.

YANG, X. J.; FAN, M. T.; SHI, J. L.; DANG, B. Isolation and identification of reponderant flora in Tibetan kefir. **China Brewing**, v. 171, p. 52–55, 2007.

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

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

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

WELMAN, A. D.; MADDOX, I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 269-274, 2003.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Isolation and characterisation of the microbial population of different South African Kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 33–37, 2004.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 383–389, 2005.

WOUTERS, J. T. M.; AYAD, E. H. E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 91–109, 2002.

WYDER, M. T.; MEILE, L.; TEUBER, M. Description of *Saccharomyces turicensis* sp. nov., a new species from kefir. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 3, p. 420-425, 1999.

ZAMMARETTIA, P.; ZISCH, A.H. Adult 'endothelial progenitor cells' renewing vasculature. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 493-503, 2005.

## CAPÍTULO II

### PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO A BASE DE POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA PRODUZIDO POR CULTURA MISTA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS DO KEFIR TIBETANO

#### RESUMO

Os exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias ácido lácticas podem ser utilizados como aditivos para as indústrias de cosméticos, indústrias de alimentos e indústrias farmacêuticas, no entanto, a produção destes exopolissacarídeos por fermentação é muito pequena e requer mais pesquisas utilizando substratos alternativos e culturas mistas para aumentar esta produção. O objetivo deste trabalho foi estudar os diferentes parâmetros para melhorar a produção do composto a base de polissacarídeo e proteína utilizando uma cultura mista de kefir tibetano e caracterizar a sua composição monossacarídica. Foi utilizado soro de leite, um subproduto da cadeia do leite, como substrato e após a otimização do meio de cultura, foi possível obter uma produção de 4,58 g/L de composto a base de polissacarídeo e proteína liofilizado. Esta produção foi maior do que as relatadas na literatura, utilizando cultura de bactérias ácido lácticas. A composição monossacarídica do polissacarídeo é galactose (39%), glicose (28%) e manose (26%) em concentração mais elevadas classificando-o como um heteropolissacarídeo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Soro de leite, kefir tibetano, polissacarídeo bacteriano, otimização.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente existe uma grande procura por polímeros naturais que têm aplicações em indústria de alimentos, indústria farmacêutica e cosmética, este interesse resultou em novas pesquisas principalmente em biotecnologia para produzir polissacárideos microbianos obtidos a partir de bactérias, fungos e algas (BADEL *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2011). O exopolissacarídeo (EPS) produzido e secretado por microrganismos pode ser amplamente utilizado como biofloculantes, bioabsorventes, aditivos alimentares, agente de remoção de metais pesados e outras aplicações (SURESH KUMAR *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008; SAIJA *et al.*, 2010).

Há poucos relatos de EPS de origem microbiana, pois a produção dessas biomoléculas por certas espécies de microrganismos é relativamente pequena. Por exemplo, EPS produzidos e secretados pelas BAL apresentam um rendimento de produção de menos de 1 g/L de EPS, em que as condições não são otimizadas (DE VUYST *et al.*, 2001; WELMAN e MADDOX, 2003; BADEL *et al.*, 2011). No entanto, as BAL são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), e os EPS excretados por este grupo de bactérias pode ser considerado como um polímero de segurança biológica, podendo ser empregado em diferentes tipos de produtos alimentícios e aplicações farmacológicas (DE VUYST *et al.*, 2001; GÓRSKA *et al.*, 2010).

Muitos microrganismos sintetizam EPS que permanecem ligados à parede celular microbiana como uma cápsula ou são liberados no meio extracelular, as BAL podem sintetizar homopolissacárideos, os quais são compostos por um único tipo de monossacárideo como glicose e frutose e são chamados de glucanas e frutanas respectivamente (VAN HIJUM *et al.*, 2006; BADEL *et al.*, 2011). Além disso, existem os heteropolissacárideos, que são compostos por vários tipos de monossacarídeos principalmente glicose, galactose, ramnose, em diferentes proporções (DE VUYST e DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO *et al.*, 2002).

O kefir tibetano é uma cultura mista que compreende grãos gelatinosos e irregulares, formado por uma associação simbiótica de leveduras e bactérias que promovem fermentação láctica em geral utilizando o leite como substrato (DINIZ *et al.*, 2003). Entretanto, o kefir tibetano é identificado erroneamente como associações

simbióticas da mesma natureza que o kombucha e kefir, ambos originados de países asiáticos (PAULINE *et al.*, 2001; DINIZ *et al.*, 2003). Esta associação é amplamente utilizada na medicina popular em países asiáticos e pode ser distinguido de outras associações pela sua composição microbiana e por substâncias sintetizadas (DINIZ *et al.*, 2003; AHMED *et al.*, 2013).

A composição microbiana do kefir tibetano compreende BAL tais como *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. kefiranofaciens*), *Lactococcus* (*L. lactis*), *Leuconostoc* (*L. citrovorum*, *L. mesenteroides*), *Streptococcus* (*S. thermophilus*, *S. lactis*), também pode ser encontrado bactérias acéticas como *Acetobacter* (*A. aceti*, *A. rasens*), e leveduras (*Kluyveromyces* sp, *Saccharomyces* sp) (JIANZHONG *et al.*, 2009).

O setor produtivo de leite no Brasil é uma das maiores cadeias alimentares brasileiras que se encontra em plena expansão e o soro de leite faz parte da cadeia produtiva de leite, sendo considerado um subproduto da produção de queijos, e parte deste soro é aproveitada em formulações de outros produtos, porém grande parte é destinada a alimentação animal e o restante é tratado e descartado, apresentando potencial de aplicação como substrato em processos fermentativos pelo baixo/nenhum custo.

O presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de um composto bioativo a base de polissacarídeo e proteína utilizando como meio fermentativo o soro de leite como substrato e cultura mista de BAL e leveduras do kefir tibetano da China. Também foi caracterizada a composição monossacarídica do composto.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CULTURA DE MICRORGANISMOS

Foi utilizada uma cultura mista de BAL e leveduras do kefir tibetano proveniente da China. O inóculo foi preparado com leite comercial esterilizado por UHT (*Ultra High Temperature*), como meio de cultura. A cultura mista foi transferida para este meio, homogeneizada e incubada a temperatura ambiente controlada (25°C) por 48 h, em seguida o meio fermentado foi filtrado e a biomassa retida foi lavada com água destilada esterilizada, e desta biomassa foram utilizados 6 g como inóculo em um volume de 100 mL de meio.

O número de células viáveis do inóculo foi determinado como Unidades Formadoras de Colônias (UFC), e para esta quantificação realizou-se diluições decimais sucessivas em 0,85% p/v de solução de cloreto de sódio, preparadas a partir da biomassa obtida após filtração do fermentado. Alíquotas de 0,1 mL foram distribuídas usando a técnica de propagação em superfície, em placas contendo ágar Rose Bengal Cloranfenicol (RBC) (Sigma-Aldrich®) para leveduras. Também foi efetuada a contagem pela técnica em profundidade utilizando 1,0 mL das diluições sucessivas em placa com ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco) para BAL em aerobiose e em condições de anaeróbicas incubadas em jarra de anaerobiose. Em seguida, as placas com RBC e com MRS foram incubadas a 30°C por 48 horas e 37°C, por 48 h, respectivamente.

Após a contagem, foi determinado que 6 g de biomassa húmida correspondem a  $10^8$  UFC de bactérias ácido lácticas por grama de biomassa húmida e  $10^8$  UFC leveduras por grama de biomassa húmida, e foram inoculadas em 100 ml de meio para fermentação submersa. Este procedimento foi utilizado em todos os estudos de fermentação submersa.

### 2.2 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SORO DE LEITE

Para a produção do composto a base de polissacarídeo e proteína (ExPP) foi utilizado soro de leite gentilmente doado por uma empresa de laticínios do estado do Paraná, o soro utilizado era proveniente da produção de queijo. Para estabelecer o

perfil físico-químico do soro de leite foram realizadas análises de umidade, cinzas, proteína, gordura, lactose e acidez, todas as determinações seguiram os padrões estabelecidos pela AOAC (1998), para análise de leite.

O teor de umidade total foi obtido pela secagem a 105°C até peso constante. As cinzas foram determinadas pela incineração em mufla a 550°C e pesagem da massa seca. A determinação de proteína foi realizada utilizando-se o método Macro-Kjeldahl, sendo a porcentagem de nitrogênio multiplicada pelo fator 6,38. O teor de lipídios utilizando-se Lactobutirômetro de Gerber. A lactose foi analisada pelo método de determinação de glicídios redutores em lactose. A acidez foi determinada por método potenciométrico com medição do valor diretamente no pHmetro HANNA INSTRUMENTS modelo HI 9321. Para todas as análises foram utilizados reagentes com grau analítico.

## 2.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXPP POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

### 2.3.1 Seleção de substratos

Foi realizado um estudo preliminar para selecionar o substrato para fermentação submersa visando a produção de ExPP. Foram testados os seguintes substratos:

- leite integral (M),
- leite desnatado (S),
- soro de leite (W),

O leite integral e o leite desnatado foram adquiridos já esterilizados por tratamento UHT e soro de leite foi pasteurizado a 63°C durante 30 min. Estes substratos foram, em seguida, inoculados com 6 g de biomassa húmida cultura mista de bactérias de ácido láctico e leveduras. A fermentação submersa ocorreu de acordo com a composição do meio em diferentes condições de agitação. As condições são apresentadas na TABELA 1. Todos os experimentos foram realizados em triplicado.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DO MEIO E CONDIÇÕES PARA FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A PRODUÇÃO DO ExPP POR CULTURA MISTA.

Meio de cultura	Agitação	Temperatura	Tempo
Leite* (MA)	120 rpm	37°C	48 h
Leite* (ME)	Estático	37°C	48 h
Leite desnatado** (SA)	120 rpm	37°C	48 h
Leite desnatado** (SE)	Estático	37°C	48 h
Soro de leite*** (WA)	120 rpm	37°C	48 h
Soro de leite ***(WE)	Estático	37°C	48 h

Leite com agitação (MA), leite estático (ME), leite desnatado com agitação (SA), leite desnatado estático (SE), soro de leite com agitação (WA) e soro de leite estático (WE).

Teor de sólidos solúveis: \*leite: 12,8°Brix, \*\*leite desnatado: 10,6°Brix, \*\*\*soro de leite: 5,4°Brix.

### 2.3.2 Estudo do efeito do pH durante a fermentação submersa

Depois de selecionado o melhor substrato para a produção de ExPP, foi realizado um estudo com diferentes concentrações de tampão (fosfato de potássio monobásico e citrato de sódio diidratado) nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10% (p/v). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do pH durante a fermentação submersa visando avaliar a produção ExPP. Também foi realizado um controle sem a adição de tampão e, portanto sem controle de pH. A fermentação foi realizada durante 48 h a 37°C, em condições estáticas e de pH inicial de 6,0.

### 2.3.3 Delineamento experimental

Primeiramente realizou-se um planejamento Plackett-Burman (11/12) para triagem (PLACKETT-BURMAN, 1946), este planejamento foi utilizado para avaliar a suplementação com diferentes fontes de carbono para a produção de ExPP no substrato escolhido.

TABELA 2. PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN (11/12) PARA A PRODUÇÃO DE ExPP COM 7 VARIÁVEIS INDEPENDENTES, 4 VARIÁVEIS FALSAS, 4 PONTOS CENTRAIS (PC) E OS VALORES DECODIFICADOS.

Ensaio	Lactose (g/L)	Glicose (g/L)	Galactose (g/L)	Sacarose (g/L)	Melaço de soja (g/L)	Melaço de cana (g/L)
1	100	0	100	0	0	0
2	100	100	0	100	20	20
3	0	100	100	0	20	0
4	100	0	100	100	0	20
5	100	100	0	100	20	0
6	100	100	100	0	20	20
7	0	100	100	100	0	20
8	0	0	100	100	20	0
9	0	0	0	100	20	20
10	100	0	0	0	20	20
11	0	100	0	0	0	20
12	0	0	0	0	0	0
13 (PC)	50	50	50	50	10	10
14 (PC)	50	50	50	50	10	10
15 (PC)	50	50	50	50	10	10
16 (PC)	50	50	50	50	10	10

Os fatores independentes foram lactose, glicose, galactose, sacarose, melaço de soja, melaço de cana e quatro variáveis falsas (D) totalizando 11 variáveis e 12 experimentos. As variáveis foram examinadas em dois níveis, baixo nível (-) indicando ausência e alto nível (+) indicando a presença da fonte de carbono. Os pontos centrais (experimentos 13-16) foram investigados em quadruplicado (TABELA 2).

Depois de selecionadas as variáveis significativas no planejamento de triagem Plackett-Burman, um planejamento fatorial fracionário de 5 fatores e 2 níveis ( $2^{5-1}$ ) foi aplicado para definir as melhores fontes de fontes de carbono, fontes de nitrogênio, e também um maior faixa de concentração. As variáveis fontes de carbono selecionadas no planejamento Plackett-Burman serviram de parâmetro para aumentar as concentrações testadas anteriormente. As variáveis para fonte de nitrogênio foram testados o extrato de levedura (0 a 20 g/L), peptona bacteriológica (0 a 20 g/L) e sulfato de amônio (0 a 20 g/L), todas foram em dois níveis, baixo (-) e

alto (+), e os pontos centrais foram investigados em quadruplicado para identificar quaisquer anomalias experimentais (TABELA 3).

As variáveis significativas obtidas nos resultados do planejamento fatorial  $2^{5-1}$  foram selecionados para a última etapa de otimização utilizando um delineamento composto central rotacional (CCRD) para a produção de ExPP. Para o CCRD, as seguintes variáveis pré-selecionadas no planejamento anterior foram glicose e peptona, também foram testados os sais de sulfato de magnésio e sulfato de manganês (TABELA 4). Estes experimentos mostraram pontos axiais (+1,682 e -1,682) e pontos centrais em quadruplicado.

TABELA 3. PLANEJAMENTO FATORIAL ( $2^{5-1}$ ) PARA A PRODUÇÃO DE ExPP COM 5 VARIÁVEIS INDEPENDENTES, 4 PONTOS CENTRAIS (PC) E OS VALORES DECODIFICADOS.

Ensaio	Glicose (g/L)	Lactose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Peptona bacteriológica (g/L)	NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (g/L)
1	150	150	20	20	20
2	150	150	20	0	0
3	150	150	0	20	0
4	150	150	0	0	20
5	150	50	20	20	0
6	150	50	20	0	20
7	150	50	0	20	20
8	150	50	0	0	0
9	50	150	20	20	0
10	50	150	20	0	20
11	50	150	0	20	20
12	50	150	0	0	0
13	50	50	20	20	20
14	50	50	20	0	0
15	50	50	0	20	0
16	50	50	0	0	20
17 (PC)	100	100	10	10	10
18 (PC)	100	100	10	10	10
19 (PC)	100	100	10	10	10
20 (PC)	100	100	10	10	10

TABELA 4. DELINEAMENTO CENTRAL COMPOSTO ROTACIONAL (CCRD). VALORES DECODIFICADOS E VALORES DE NÍVEIS DE FATORES TESTADOS CODIFICADOS: GLICOSE, PEPTONA BACTERIOLÓGICA, SULFATO DE MAGNÉSIO E SULFATO DE MANGANÊS.

Ensaio	Glicose (g/L)	Peptona bacteriológica (g/L)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	MnSO <sub>4</sub> (g/L)
1	450 (+1)	30 (+1)	7.5 (+1)	0.25 (-1)
2	450 (+1)	30 (+1)	2.5 (-1)	0.25 (-1)
3	450 (+1)	10 (-1)	7.5 (+1)	0.75 (+1)
4	150 (-1)	30 (+1)	2.5 (-1)	0.75 (+1)
5	450 (+1)	10 (-1)	2.5 (-1)	0.75 (+1)
6	150 (-1)	10 (-1)	7.5 (+1)	0.25 (-1)
7	150 (-1)	30 (+1)	7.5 (+1)	0.75 (+1)
8	150 (-1)	10 (-1)	2.5 (-1)	0.25 (-1)
9	100.2(-1.682)	20 (0)	5.0 (0)	0.5 (0)
10	550.2(+1.682)	20 (0)	5.0 (0)	0.5 (0)
11	300 (0)	6.8 (-1.682)	5.0 (0)	0.5 (0)
12	300 (0)	30.68(+1.682)	5.0 (0)	0.5 (0)
13	300 (0)	20 (0)	1.7(-1.682)	0.5 (0)
14	300 (0)	20 (0)	9.2 (+1.682)	0.5 (0)
15	300 (0)	20 (0)	5.0 (0)	0.17(-1.682)
16	300 (0)	20 (0)	5.0 (0)	0.92 (+1.682)
17 (PC)	300 (0)	20 (0)	5.0 (0)	0.5 (0)
18 (PC)	300 (0)	20 (0)	5.0 (0)	0.5 (0)
19 (PC)	300 (0)	20 (0)	5.0 (0)	0.5 (0)
20 (PC)	300 (0)	20 (0)	5.0 (0)	0.5 (0)

### 2.3.4 Cinética da produção de ExPP em biorreator

O estudo de cinética da produção de ExPP foi realizado em biorreator STR 14 L (Bioflo 110 fermentador, New Brunswick Scientific, EUA), em condições ideais estabelecidas anteriormente (FIGURA 1). O meio foi composto por soro de leite suplementado com 30% de glicose (p/v), 2% de peptona bacteriológica (p/v), 4% de fofato de potássio monobásico (p/v) e 4% de citrato de sódio diidratado (p/v). Todos os reagentes utilizados apresentaram grau analítico. A taxa de inóculo foi de 6% (p/v) com  $10^8$  UFC/g para BAL  $10^8$  UFC/g para leveduras, a fermentação foi

conduzida por um tempo de 54 h e temperatura de 37°C. Foram realizadas amostragens a cada 6 h.

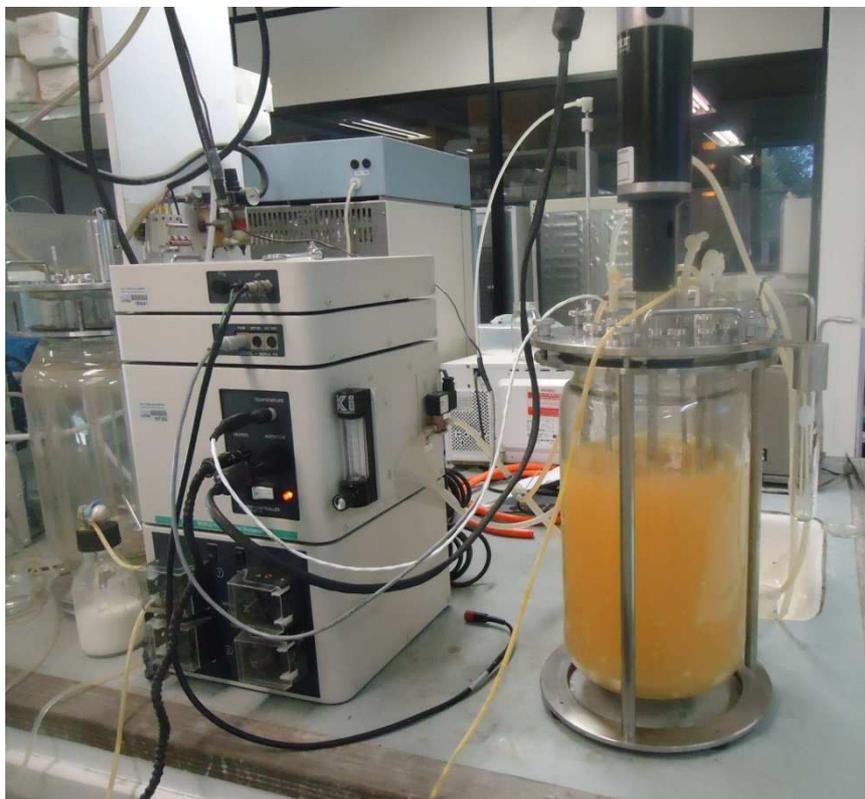


FIGURA 1. PRODUÇÃO DE ExPP EM BIORREATOR.  
FONTE: O autor, 2014.

## 2.4 ANÁLISES QUANTITATIVAS

Para analisar a quantidade de polissacarídeo e proteínas que compõe o ExPP foram realizadas as análises de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), açúcares redutores pelo método de DNS (MILLER, 1959), e a quantificação de proteínas pelo método de Lowry's (LOWRY *et al.*, 1951). Todos os reagentes utilizados possuíam grau analítico.

## 2.5 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO EXPP

Para o processo de recuperação e purificação a metodologia foi adaptada a partir do processo descrito por Canquil, *et al.* (2007). Ao término da fermentação, o fermentado foi filtrado e centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi tratado com solução de TCA 10% e novamente centrifugado nas mesmas condições. O precipitado foi descartado e o sobrenadante tratado com etanol absoluto a 4°C na proporção de 1:3 e deixado à amostra em repouso a temperatura de 4°C por 24 h, após o tempo de precipitação o material foi centrifugado nas mesmas condições e novamente precipitado. Depois de precipitado e centrifugado nas mesmas condições o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em água destilada e dializado em membrana de dialise de 10-12 kDa por 72 h contra água destilada. O material dializado foi congelado e liofilizado (freeze-dryer, Modulyo<sup>R</sup>, Thermo Electron). O ExPP liofilizado foi armazenado a temperatura ambiente.

## 2.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EXPP

Aproximadamente 1 mg de ExPP liofilizado foi submetido a hidrólise ácida total com 1 mL de ácido trifluoroacético 1 M, durante 4 horas a 100°C. Em seguida, foi reduzido com 20 mg de boro-hidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) durante 12 h. Após redução, o conteúdo foi neutralizado (pH 5-6) com 50% v/v de ácido acético e liofilizado. O produto seco foi co-destilado com metanol para a remoção de sais de boro. A seguir, uma etapa de acetilação foi realizada com 1 mL de anidrido acético durante 1 hora a 120°C, e os monossacarídeos foram analisados como derivados de acetato de alditol por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) num sistema de cromatografia Varian 3800, usando hélio como fase celular (1,0 mL/ min) em uma coluna capilar DB-225ms (Durabond, 30 m x 0,25 mm, diâmetro interno de 0,25 µm). As áreas dos picos foram determinadas por integração utilizando o software Varian MS Dados Review. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

## 2.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro (BRUKER, modelo DRX 400, série Avance) em tubos de 5 mm de diâmetro e aproximadamente 20 cm de comprimento na temperatura de 70°C. Os 46 deslocamentos químicos foram expressos em ppm. A acetona foi empregada como padrão interno para as análises de  $^{13}\text{C}$ , em 31,45 ppm.

Para a realização da análise de RMN Monodimensionais para carbono  $^{13}\text{C}$  (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) utilizou-se a frequência base de 100,16 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 70.000 aquisições, com intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram solubilizadas em D<sub>2</sub>O (água deuterada) diluída em água destilada na proporção de 1:10, na concentração de 80 mg/mL (pH 7).

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados da otimização foi utilizado o software Statsoft Inc., versão 5.1, EUA. Também foram empregados os teste de normalidade, a análise de variância (ANOVA) e um pós-teste com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO SORO DE LEITE

Foi utilizado soro de leite doce obtido da fabricação de queijo e retirado durante o processo de dessoragem antes da salga classificado como um subproduto e desnatado na própria indústria de laticínios. Uma amostra foi analisada em triplicata e apresentou a composição físico-química demonstrada na TABELA 5. Observa-se que ele possui uma baixa concentração de proteínas de 0,55% e a porcentagem de lactose é de 4,6%. O soro doce possui um pH ~ 6,0 indicando que não foi necessário fazer correção do mesmo antes de iniciar a produção do ExPP por fermentação.

TABELA 5. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORO DE LEITE

Constituintes	Concentração em %
Água	93,6 % ± 0,37
Gordura	0,05 % ± 0,01
Proteína	0,55 % ± 0,04
Lactose	4,67 % ± 0,34
Cinzas	0,53 % ± 0,12

Para todos os experimentos utilizou-se o mesmo lote de soro de leite com as mesmas características físico-químicas, a fim de atender a ICH (1995) e a ANVISA (2011), as quais preconizam que para a produção de biomoléculas por processos fermentativos é necessário manter as condições de produção como: linhagem de microrganismos, lotes de meios de cultivos padronizados e sempre com as mesmas características físico-químicas, pois qualquer mudança nestes parâmetros interfere diretamente na qualidade e características da biomolécula produzida o que inviabiliza qualquer estudo, bem como a reprodutibilidade do mesmo.

## 3.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXPP POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

### 3.2.1 Seleção de substrato

As melhores condições para a produção de ExPP (1,066 g/L) foram obtidas com o soro de leite como substrato e sem agitação, o segundo melhor resultado foi com o soro de leite e com agitação (0,78 g/L) e seguido do uso de leite desnatado com agitação (0,47 g/L). A menor produção de ExPP foi obtida utilizando o leite integral com agitação com uma produção de 0,387 g/L (FIGURA 2). De acordo com a análise estatística ANOVA foi possível observar uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) sobre o ExPP produzido e os substratos testados. O pós-teste de Tukey mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na produção de ExPP entre o soro de leite sob agitação e os demais substratos testados na condição estática e agitação. Além disso, as diferenças estatisticamente significativas também foram identificadas quando analisado os resultados da produção de ExPP com leite sob agitação e leite sob condição estática.

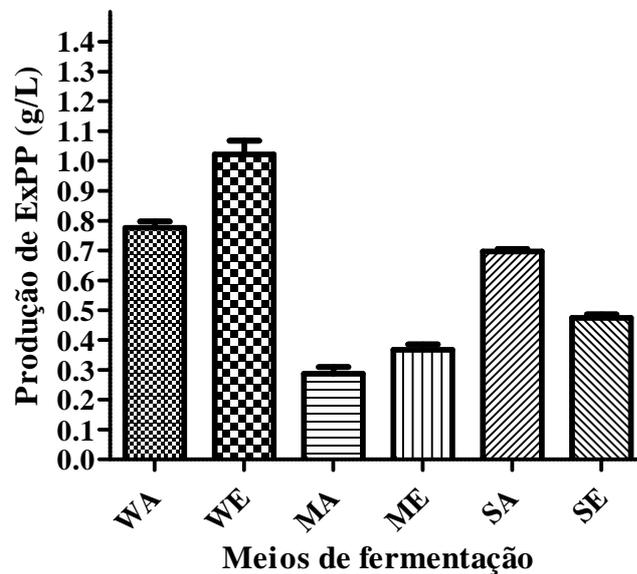


FIGURA 2. PRODUÇÃO DE ExPP EM DIFERENTES SUBSTRATOS E DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO.

Leite com agitação (MA), leite estático (ME), leite desnatado com agitação (SA), leite desnatado estático (SE), soro de leite com agitação (WA) e soro de leite estático (WE).

Wang *et al.* (2010), trabalhou com *L. plantarum* KF5 isolado a partir de Kefir do Tibete, usou o soro de leite suplementado com lactose, glicose, triptona, cisteína, acetato de sódio, Tween 80 para a produção de polissacarídeo. Após a otimização os pesquisadores obtiveram 0,955 g/L de produção. Comparando estes resultados apresentados com os obtidos no primeiro estudo deste trabalho, reforça que o soro de leite apresenta um bom desempenho como substrato em fermentação submersa visando a produção de ExPP.

### 3.2.2 EFEITO DO CONTROLE DE pH DURANTE A PRODUÇÃO DO COMPOSTO A BASE DE POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA

Pesquisas com bactérias ácido lácticas para a produção de exopolissacarídeo mostraram que o pH próximo a 6,0 favorece a produção de exopolissacarídeo. A diminuição do pH está relacionado com o aumento na concentração de lactato, em seguida, ocorre a acidificação e, conseqüentemente, a enzima glicohidrolase é ativada, principalmente com pH próximo de 5,0. A enzima glicohidrolase promove a degradação de polissacarídeo presente no meio (PHAM *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2008). Desta maneira é importante manter o pH próximo de 6,0 durante o processo fermentativo.

Foi realizado um experimento com diferentes concentrações de tampão com o intuito de avaliar o pH e a produção de ExPP, para tanto foram utilizados fosfato de sódio monobásico e citrato de sódio diidratado nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8% e 10% (p/v). Após 48 horas de fermentação, a produção de ExPP foi quantificada e acompanhado a evolução do pH, o qual diminuiu para 5,21 quando utilizada a concentração de tampão de 2% (p/v). Quando foram utilizadas as concentrações mais altas (4, 6, 8 e 10% p/v) de tampão a pH permaneceu 6,0 o que é o ideal.

Na avaliação estatística de variância, observou-se que não houve diferença significativa ao nível de 5% para as concentrações de tampão de 4%, 6%, 8% e 10% (p/v) com produção de ExPP em 2,77 g/L como demonstrado na FIGURA 3. Entretanto, quando comparando a produção de ExPP entre os ensaios com tampão e controle (sem tampão) a diferença é altamente significativa

A análise estatística de variância observou-se que não houve uma diferença significativa ao nível de 5% para concentrações de tampão de 4 a 10% e os EPS produção permaneceu em 2,77 g/L para a concentração de 4, 6, 8 e 10% (p/v) (FIGURA 2). No entanto, quando se compara a produção de EPS entre os experimentos com tampão e controle (sem tampão) foi observada uma diferença altamente significativa ( $p < 0,05$ ). Também se tem diferença altamente significativa ( $< 0,05$ ) comparando os resultados de produção de ExPP dos ensaios com 2% de tampão e as demais concentrações.

Em estudo relatado por Macedo *et al.* (2002), a produção de polissacarídeo foi de 2,76 g/L utilizando *L. rhamnosus* em permeado de soro de leite com 1% (p/v) de tampão fosfato de potássio monobásico e citrato de sódio diidratado e enriquecido com outras fontes de nitrogênio. O resultado obtido por Macedo *et al.* (2002), é um dos maiores valores de produção de polissacarídeo por bactérias ácido lácticas já relatado. No presente trabalho obteve-se uma produção de 2,77 g/L ExPP foi atingida somente com o controle de pH em 6,0 e sem enriquecer o soro de leite com fontes de carbono e nitrogênio.

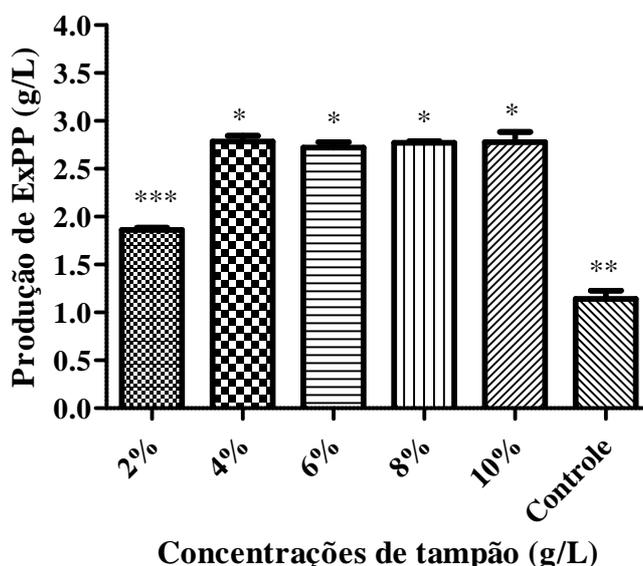


FIGURA 3. PRODUÇÃO DE ExPP EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TAMPÃO.

\* Não existe diferença significativa

\*\* Existe diferença significativa entre os ensaios com tampão e o controle

\*\*\* Existe diferença significativa entre as concentrações quando comparadas com a concentração de 2%

### 3.2.3 Delineamento experimental

O soro de leite tem a composição demonstrada na TABELA 1, a qual é relativamente pobre para o crescimento microbiano e, conseqüentemente, para a produção do ExPP, sendo necessário testar algumas fontes de carbono e nitrogênio para a suplementação do soro de leite.

Para melhorar a produção do ExPP por bactérias ácido lácticas é necessário ter uma boa fonte de carbono e de nitrogênio, bem como condições físico-químicas tais como a temperatura, o pH, a agitação adequados, estes parâmetros promovem o crescimento microbiano e, portanto, a produção de polissacarídeos (MADDOX *et al.*, 2003; BADEL *et al.*, 2011). Para melhorar a produção de polissacarídeo bacteriano é essencial a presença de nutrientes que favoreçam, como uma boa fonte de carbono. Muitas vezes, a elevada proporção de C:N tem sido descrito como condições ambientais desejáveis para a produção de quantidades mais significativas de metabólitos como polissacarídeo (NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003). Além disso, a fonte de carbono é específica para cada estirpe de BAL, e estas fontes utilizadas na composição do meio fermentativo podem estar relacionadas com a composição monossacarídica do polissacarídeo produzindo (GAO *et al.*, 2012; AHMED *et al.*, 2013).

Segundo Haaland (1989), a maior parte dos processos biotecnológicos não possuem modelos teóricos que possam ser usados para explicar o desenvolvimento do processo. Contudo existem limitações de tempo e recursos, tornando a produtividade do processo de importância crítica, dessa forma, o planejamento e a resolução dos problemas utilizando ferramentas estatísticas resulta em uma melhor resolução das possibilidades de maximizar a eficiência e produtividade.

Sendo assim foi realizado um estudo com planejamentos estatísticos para elencar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para maximizar a produção do ExPP, para tanto foi utilizado o software Statsoft Inc., versão 5.1, EUA. O primeiro planejamento foi o delineamento experimental Plackett-Burman 11/12 para selecionar e determinar os níveis ótimos de algumas variáveis que influenciam a produção de ExPP.

O coeficiente de correlação é normalmente usado como medida do ajuste e deve ser próximo a 1,0 para um bom modelo estatístico (PLACKETT e BURMAN,

1946). Neste estudo, foi obtido  $R^2 = 0,76$  indicando que 76% dos dados experimentais de produção de ExPP apresentaram ajuste satisfatório.

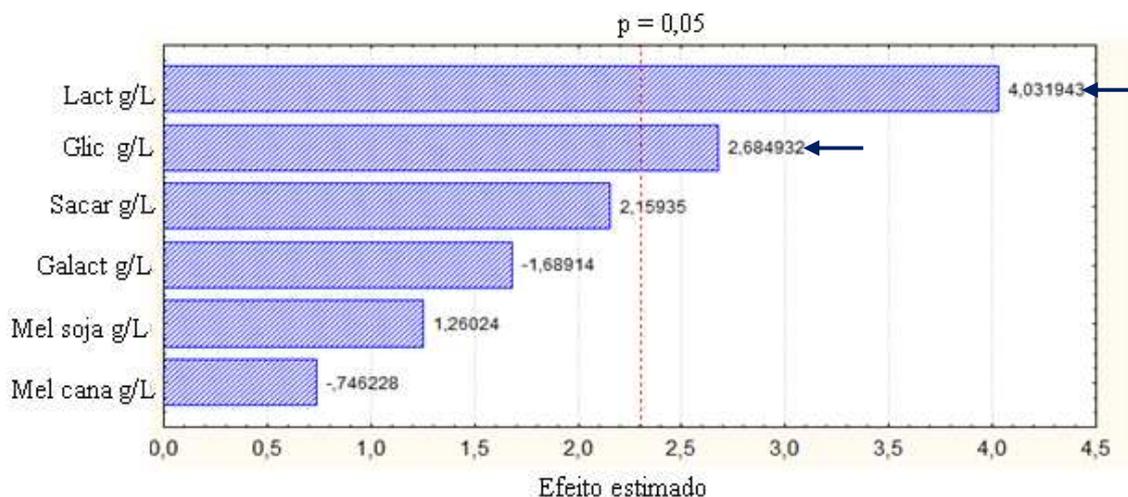


FIGURA 4. DIAGRAMA DE PARETO PARA DIFERENTES FONTES DE CARBONO. Com nível de significância de 5%, na ponta da seta as variáveis significativas para a produção de ExPP. As setas indicam as variáveis significativas.

A análise estatística de variância (ANOVA) permitiu determinar que os valores abaixo de  $p < 0,05$  indicam variáveis que diferem significativamente. Para este estudo, as variáveis de lactose ( $p = 0,0028$ ) e de glicose ( $p = 0,022$ ) foram às fontes de carbono que apresentaram efeito significativo na a produção de ExPP, como apresentado na FIGURA 4. A lactose testada como fonte de carbono para a produção de ExPP também foi relatada por Macedo *et al.* (2002), que em seu estudo uso a lactose para suplementar o soro permeado, constatou que durante a fermentação com a cepa *L. rhamnosus* atingiu uma produção de polissacarídeo de 2,76 g/L. No presente trabalho a maior produção de ExPP foi com o uso de glicose (100 g/L) com uma produção de 3,4 g/L, portanto a glicose foi escolhida como fonte de carbono, além de apresentar um custo inferior ao da lactose.

Depois de escolhido a lactose e a glicose como fontes de carbono para o próximo planejamento, foi realizado um planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$ , com o intuito de definir as melhores fontes de carbono e nitrogênio, em uma faixa de concentração específica. O coeficiente de variação utilizado foi ao nível de significância de 5%, e este planejamento apresentou o coeficiente de determinação de  $R^2 = 0,948$ . A glicose mostrou-se como uma variável altamente significativa ( $p =$

0,004) com o efeito positivo (+ 0,9275) para a produção de ExPP, sendo assim as melhores variáveis foram a glicose e a peptona como demonstrado na FIGURA 5. Além disso, a peptona fonte de nitrogênio apresentou nível de significância de 5% ( $p = 0,026$ ) também com um efeito positivo (+ 0,544). Os experimentos 2 e 5 apresentaram os valores mais elevados de produção de ExPP de 3,67 g/L e 3,65 g/L, respectivamente, que contém o alta concentração de glicose, lactose e extrato de levedura. O segundo melhor resultado foi obtido também com a presença de glicose, extrato de levedura e peptona com produção de 3,30 g/L de ExPP.

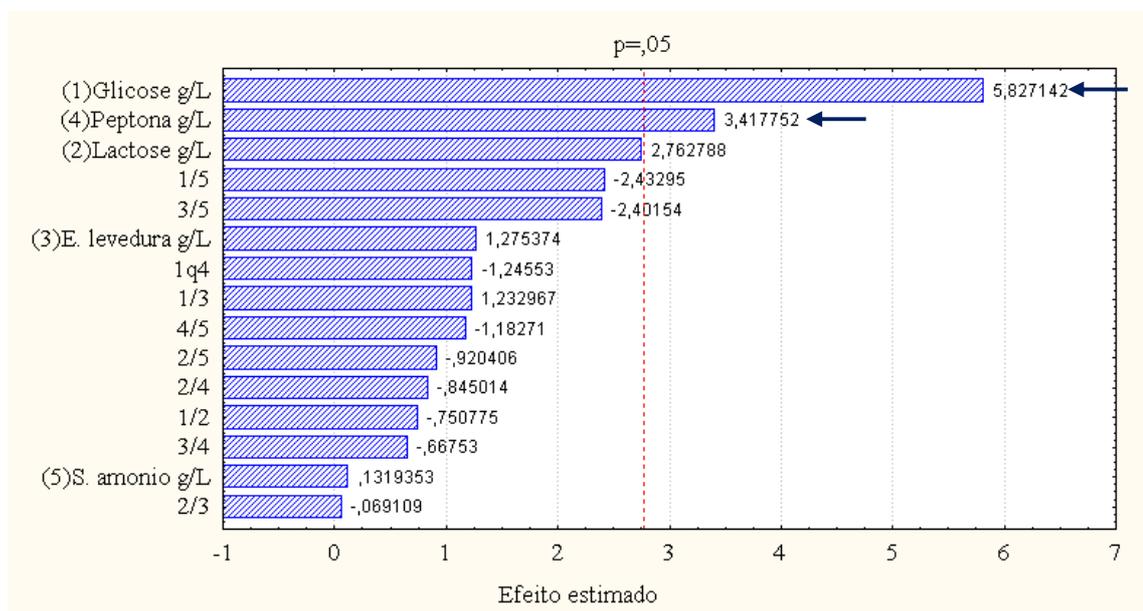


FIGURA 5. DIAGRAMA DE PARETO PARA DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

Com nível de significância de 5%, na ponta da seta as variáveis significativas. As setas indicam as variáveis significativas.

De acordo com Enikeev (2012), a fonte de nitrogênio não era tão importante para a produção de polissacarídeo, ele confirmou que o citrato de amônio (0,8% p/v) não foi significativo ( $p < 0,05$ ) para a produção de exopolissacarídeo quando testado em substrato usando leite desnatado e cultura de microrganismos do kefir proveniente de Krasny Yar, Samarskaya, Rússia. No entanto, uma boa fonte de nitrogênio é importante para melhorar o crescimento microbiano, conseqüentemente, a produção de exopolissacarídeos pode aumentar devido a sua possível associação com a fase de crescimento microbiano. A quantidade de exopolissacarídeos produzidos por cultura bacteriana está muitas vezes ligada à produção de biomassa (DE VUYST e DEGEEST, 1999). Macedo *et al.* (2002), constataram que a produção

máxima exopolissacarídeo usando *L. rhamnosus* ocorreu durante o crescimento exponencial.

A partir do planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$ , foram fixadas as fontes de carbono com a glicose e a de nitrogênio com a peptona, e então foi realizado um delineamento composto central rotacional (CCRD). Neste estudo, o sulfato de magnésio e sulfato de manganês, foram testados como promotores de crescimento, alguns autores, tais como Macedo *et al.* (2002), Kumar *et al.* (2007), relataram que o sulfato de magnésio e sulfato de manganês são considerados promotores que favorecem o crescimento de bactérias ácido lácticas e, portanto, podem promover um incremento na produção de exopolissacarídeos.

A análise estatística do CCDR apresentou que as variáveis glicose ( $p = 0,0389$ ) e peptona ( $p = 0,0465$ ) foram significativas ao nível de 5% para a produção de ExPP, no entanto, os sais de sulfato de magnésio e sulfato de manganês não tiveram nenhuma influência sobre a produção. De acordo com a análise de variância (ANOVA) o CCDR tinha um  $R^2 = 0,867$ .

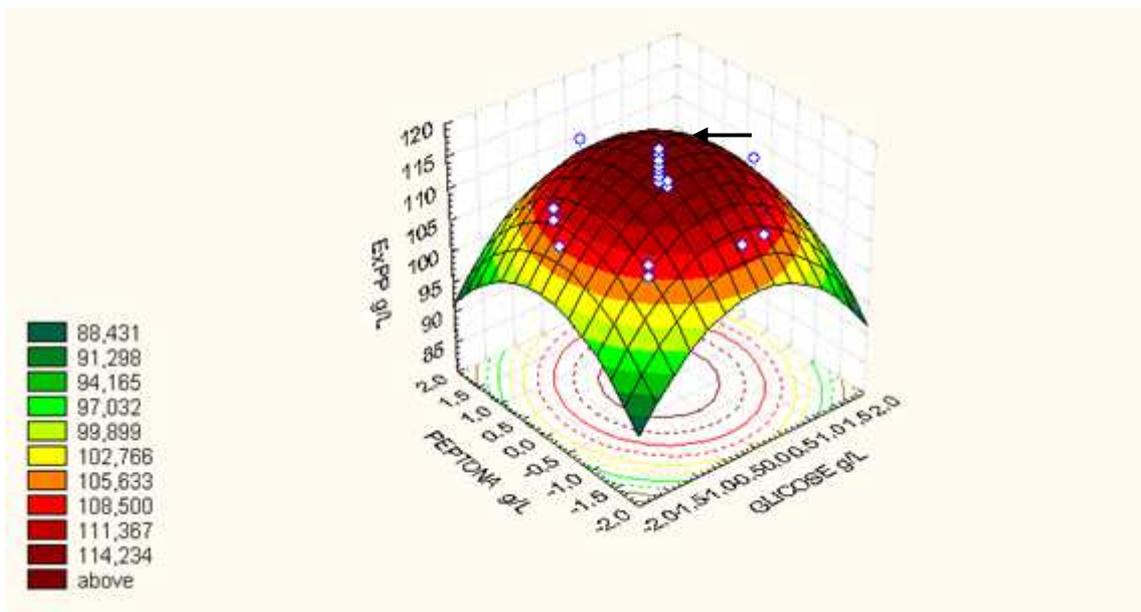


FIGURA 6. GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DEMONSTRANDO AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES GLICOSE E PEPTONA NA PRODUÇÃO DE ExPP.

Seta indicando a região para a produção máxima de ExPP localizada nos pontos centrais.

Observando a FIGURA 6, a superfície de resposta descreve a variação na produção de ExPP quando diferentes concentrações de glicose e peptona foram adicionadas no meio de cultura para a fermentação, até obter o ponto ótimo, quando

o nível (superior ou inferior) aparecer inteiro no centro da superfície, sugerindo que o aumento ou diminuição de qualquer fator irá afetar negativamente a variável resposta. Esta superfície é representada pelo modelo da equação 1.

Equação 1:

$$\text{ExPP (g/L)} = 3,85 + 0,218\text{GLICOSE} - 0,744\text{GLICOSE}^2 + 0,257\text{PEPTONA} - 0,0668\text{PEPTONA}^2$$

O termo linear da variável glicose apresentou um ligeiro efeito positivo (0,218) sobre a produção de ExPP, enquanto que o seu termo quadrático apresentou efeito negativo (- 0,744). Para a peptona o termo linear apresentou igualmente um ligeiro efeito positivo (0,257) e o termo quadrático efeito negativo (- 0,0668), de acordo com a Equação 1. Observou-se também que o termo de interação (GLICOSExPEPTONA) não apresentou significância em  $p < 0,05$ . Por isso, foi desconsiderado no modelo de construção da equação.

### **3.2.4 Cinética da produção de ExPP em biorreator**

A partir dos planejamentos experimentais foi possível definir a melhor composição de suplementos para serem adicionados no soro de leite, e em seguida foi realizado um estudo ( $n = 3$ ) de fermentação em biorreator com tempo de 54 h. A TABELA 6 apresenta os parâmetros cinéticos da produção de ExPP e de formação de biomassa nas condições otimizadas.

TABELA 6. PARÂMETROS CINÉTICO PARA A PRODUÇÃO DE ExPP.

Tempo (h)	Açúcares totais (g/L)	ExPP (g/L)	Biomassa (g/L)	$\Delta S$	$\Delta P$	$\Delta X$
0	298,90 $\pm$ 0,55	0,00 $\pm$ 0,00	22,91 $\pm$ 1,09			
6	287,50 $\pm$ 1,00	0,46 $\pm$ 0,40	27,44 $\pm$ 1,02	11,40	0,46	4,53
12	262,10 $\pm$ 0,91	0,98 $\pm$ 0,33	30,97 $\pm$ 1,13	36,80	0,98	8,05
18	239,60 $\pm$ 0,92	1,58 $\pm$ 0,33	33,12 $\pm$ 0,51	59,30	1,58	10,21
24	217,50 $\pm$ 1,61	2,76 $\pm$ 0,74	34,62 $\pm$ 1,11	81,40	2,76	11,70
30	189,00 $\pm$ 0,58	3,56 $\pm$ 0,49	37,91 $\pm$ 1,66	109,90	3,56	15,00
36	125,00 $\pm$ 1,00	4,07 $\pm$ 0,74	43,79 $\pm$ 1,02	173,90	4,07	20,87
42	104,65 $\pm$ 2,03	4,58 $\pm$ 0,96	45,54 $\pm$ 1,06	194,25	4,58	22,63
48	92,00 $\pm$ 1,00	4,60 $\pm$ 0,67	45,52 $\pm$ 0,33	206,90	4,60	22,61
54	90,10 $\pm$ 0,55	4,61 $\pm$ 0,23	45,54 $\pm$ 1,02	208,80	4,61	22,62

$\Delta S$  – variação do substrato,  $\Delta P$  – variação do produto,  $\Delta X$  – variação da biomassa.

A fermentação em biorreator resultou num aumento da produção de ExPP de 0 g/L a 4,58 g/L num período de 42 horas de fermentação, quando comparado com a produção de ExPP em frascos (atingiu um máximo produção de 3,9 g/L). Após 42 h a produção praticamente manteve-se constante 4,60 g/L e 4,61 g/L em 48 h e 54 h, respectivamente, como observado na FIGURA 7. A biomassa (peso seco) alcançou 45,54 g/L em 42 h, e permaneceu constante até 54 h, caracterizando as fases exponencial e estacionária do desenvolvimento microbiano. Comportamento semelhante foi observado por DE Vuyst e Degeest (1999), os quais afirmaram que a produção de polissacarídeo ocorre durante a produção de biomassa por BAL em processo fermentativo.

Neste trabalho, a redução de açúcares totais ocorreu de forma mais intensa no prazo de 42 h de fermentação (concentração reduzida de 298,9 g/L para 90,1 g/L). Após 42 horas, ele diminui lentamente e não apresentou diferença significativa.

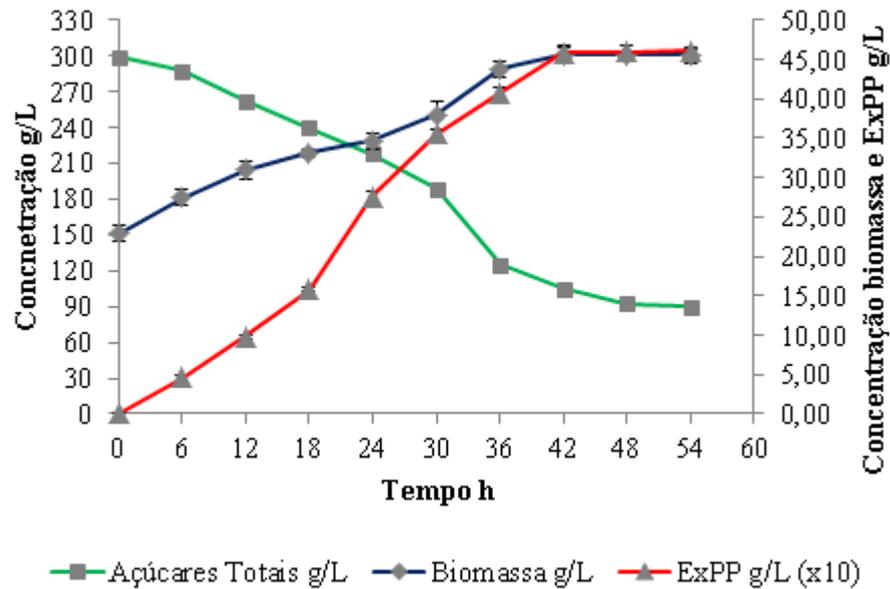


FIGURA 7. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ExPP (g/L), BIOMASSA (g/L) E CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS DURANTE 54 H DE FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR.

A evolução das taxas de produção de consumo de açúcares totais em função das taxas de produção de ExPP estão demonstradas na FIGURA 8, sendo possível observar que existe uma correlação de perfeita linearidade entre esses dois parâmetros a cada hora de fermentação.

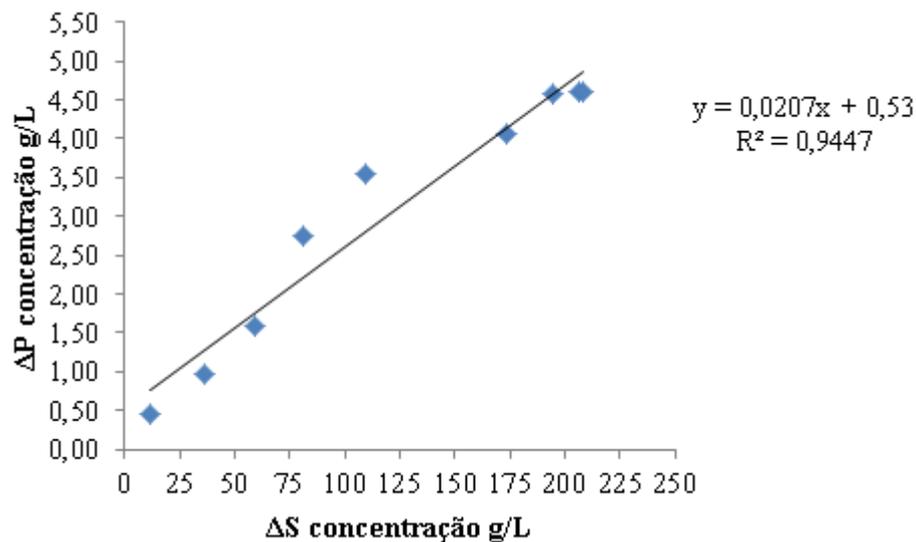


FIGURA 8. EVOLUÇÃO DA TAXA DE PRODUÇÃO DE ExPP  
 $\Delta P$  – variação do produto,  $\Delta S$  – variação do substrato.

No início dos estudos de otimização da produção de ExPP utilizando a cultura mista do kefir tibetano, tinha uma produção de 0,39 g/L usando apenas o leite como

meio de cultivo, a escolha do soro de leite e suplementação nutricional foi possível obter um aumento gradual na produção de ExPP (TABELA 7) . Macedo *et al.* (2002), alcançaram um rendimento máximo de 2,76 g/L de exopolissacarídeo usando *L. rhamnosus*, enquanto Wang *et al.* (2010), obtiveram uma produção de 0,955 g/L de exopolissacarídeo trabalhando com *L. plantarum* isolado do kefir.

O composto a base de polissacarídeo e proteínas (ExPP) apresenta 70% de polissacarídeos e aproximadamente 30 % de proteínas, sendo assim a produção ao final do processo de otimização como apresentado na TABELA 7, foi de 4,58 g/L de ExPP total composto por 3,20 g/L de polissacarídeo e 1,37 g/L de proteínas, comparando a produção de polissacarídeo obtida com as produções relatadas anteriormente é possível afirmar que o soro de leite suplementado e as condições trabalhadas favorecem a produção do ExPP.

TABELA 7. AUMENTO NA PRODUÇÃO DE ExPP DURANTE AS ETAPAS DE OTIMIZAÇÃO.

Meio de cultura	Produção de ExPP g/L
ME	0,39
WE	1,06
WE tamponado	2,77
Planejamento experimental Plackett-Burman	3,40
Planejamento experimental fatorial 2 <sup>5-1</sup>	3,64
Planejamento experimental CCDR	3,83
Fermentação em biorreator	4,58

ME – leite estático, WE – soro de leite estático.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO ExPP

O ExPP obtido a partir do processo de fermentação do kefir tibetano utilizando o soro de leite suplementado como meio, foi analisado com n = 3 para determinar a composição monossacarídica. Como apresentado na TABELA 8 o ExPP apresentou maiores concentrações de galactose, glucose e manose, também possui concentrações bem pequenas de ramnose e arabinose. Pela presença de diferentes monossacarídeos o ExPP produzido no presente trabalho é classificado como um heteropolissacarídeo.

TABELA 8. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO ExPP.

Monossacarídeos	Porcentagem (%)
Galactose	39 ± 0.56
Glicose	28 ± 0.65
Manose	26 ± 0.25
Arabinose	4 ± 0.21
Ramnose	3 ± 0.10

Os heteropolissacarídeos produzidos pelas BAL são principalmente formados por repetidas unidades de galactose, glicose e ramnose para os principais monossacarídeos, mas também pode ter outros monossacarídeos (HARDING *et al.*, 2005; SANCHES *et al.*, 2006). E eles são muitas vezes altamente ramificados com diferentes tipos de ligações e as designações para o heteropolissacarídeo é complexo e depende do monossacarídeo primário (BADEL *et al.*, 2011). Os heteropolissacarídeos são feitos por polimerização com repetição de precursores unitários formados no citoplasma (CERNING, 1995), necessitando de um meio rico em carboidratos. Wang *et al.* (2008), determinaram a composição monossacárido do exopolissacarídeo produzido por *Lactobacillus kefiranofaciens* Zw3 isolado a partir do Tibete kefir e identificaram apenas a presença de galactose e glicose classificando-o como heteropolissacarídeo. Esta composição é semelhante ao encontrado em estudos anteriores de exopolissacarídeo de *L. kefiranofaciens* isolado de kefir (MAEDA *et al.*, 2004).

### 3.4 ANÁLISE DE RMN 13C

O espectro de RMN de 13C do ExPP como apresentado na figura 9, deixa claro que não apresenta sinal indicativo de sulfato presente na amostra, e os sinais de alta intensidade entre 71 - 80 ppm são característicos da região do anel (C-2, C-3 e C-4) da estrutura de carboidrato, também é nítido o sinal do C-6 entre 60,05 e 61,1 ppm.

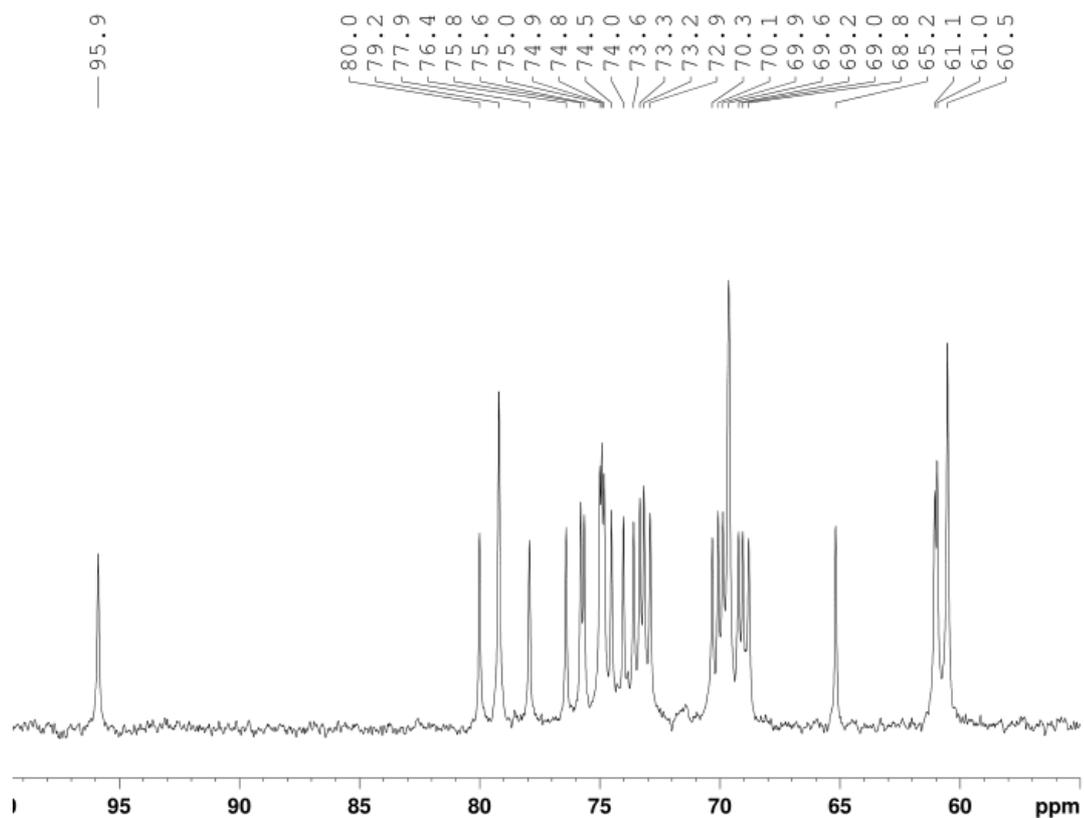


FIGURA 9 ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO ExPP

NOTA: Solvente D<sub>2</sub>O (70 °C); acetona como padrão interno (31,45 ppm).

Ainda é possível observar que o sinal em 96 ppm é característico de carbono anomérico com terminal livre redutor o que caracteriza a presença de glicose, o que confirma a composição monossacarídica com a presença de 28% na estrutura do polissacarídeo analisado. E não foi observado sinal indicativo de ácido urânico.

#### **4. CONCLUSÃO**

O melhor meio para a produção do composto a base de polissacarídeo e proteína foi o soro de leite doce suplementado com glicose, peptona bacteriológica, fosfato de potássio monobásico e citrato de sódio diidratado. Ao final do processo de otimização e utilizando biorreator obteve-se a maior produção de composto a base de polissacarídeo e proteína, esta produção de polissacarídeo nunca havia sido alcançada. De acordo com a composição monossacarídica do ExPP, ele foi classificado como um heteropolissacarídeo com altas concentrações de galactose e glicose.

## REFERÊNCIAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Realização do Exercício de Comparabilidade para Registro de Produtos Biológicos**. Brasília, p.12, 2011.
- AHMED Z.; WANG Y.; ANJUM N.; AHMADC A.; KHAN S. T. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir e Part II. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 343-350, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**, 16.ed. 4. rev. Washington, 1998.
- BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspective for Lactobaclli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 54-66, 2011.
- CANQUIL, N.; VILLARROEL, M.; BRAVO, S.; RUBILAR, M.; SHENE, C. Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 270–279, 2007.
- CERNING, J. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. **Lait**, v.75, p. 463-472, 1995.
- DINIZ R.; GARLA, L. K.; SCHNEEDORF, J. M.; CARVALHO, J. C. T. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. **Pharm. Res.** v. 47, p. 49-52, 2003.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; SMITH, P. A. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analitical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 153-177, 1999.
- DE VUYST, L.; DE VIN, F.; KAMERLING, J. P. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 687-707, 2001.
- ENIKEEV, R. Development of a new method for determination of exopolysaccharide quantity in fermented milk products and its application in technology of kefir production. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2437-2441, 2012.
- FREITAS F.; ALVES V. D.; REIS M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 388-398, 2011.
- GAO, J.; GU, F.; RUAN, H.; CHEN, Q.; HE, J.; HE, G. Culture conditions optimization of Tibetan kefir grains by response surface methodology. **Procedia Engineering**, v. 37, p. 132-136, 2012.

GORSKA, S.; JACHYMEK, W.; RYBKA, J.; STRUS, M.; HECZKO, P. B.; GAMIAN, A. Structural and immunochemical studies of neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus johnsonii* 142. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 108-114, 2010.

HARDING, L. P.; MARSHALL, V. M.; HERNANDEZ, Y.; GU, Y.; MAQSOOD, M.; MCLAY, N. Structural characterization of a highly branched exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2074. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 1107–1111, 2005.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Harmonised tripartite guideline - Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological. USA, p. 8, 1995.

JIANZHONG, Z.; XIAOLI, L.; HANHU, J.; MINGSHENG, D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26, p. 770–775, 2009.

KIM, Y.; KIM, J. U.; OH, S.; KIM, Y. J.; KIM, M.; KIM, S. H. Technical optimization of culture conditions for the production of exopolysaccharide (EPS) by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. **Food Science and Biotechnology**, v. 17, p. 587–593, 2008.

KUMAR, A. S.; MODY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides a perception. **Journal of Basic Microbiology**. v. 47, p. 103-117, 2007.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, K.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 183, p. 265, 1951.

MACEDO, M. G.; LACROIXA, C.; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* W-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 419–426, 2002.

MAEDA, H.; ZHU, X.; OMURA, K.; SUZUKI, S.; KITAMURA, S. Structural characterization and biological activite of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 5533–5538, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**. v. 38, p. 1513-1519, 2003.

PAULINE, T.; DIPTI, P.; ANJU, B.; KAWIMANI, S.; SHARMA, S. K.; KAIN, A. K. Studies on toxicity, anti-stress and hepato-protective properties of kombucha tea. **Biomed Environ Sci.**, v. 14, p.207-213, 2001.

PHAM, P. L.; DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G.; CERNING, J. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2302–2310, 2000.

PLACKETT, R.L.; BURMAN, J.P. The design of multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, p. 305–325, 1946.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163–171. 2002.

SAIJA, N.; WELMAN, A.; BENNET, R. Development of a dairy-based exopolysaccharide bioingredient. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 603-608, 2010.

SÁNCHEZ, J. I.; MARTINEZ, B.; GUILLEN, R.; JIMENEZ-DIAZ, R.; RODRIGUEZ, A. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, p. 7495–7502, 2006.

SURESH KUMAR, A.; MODY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p 103-117, 2008.

VAN HIJUM, A. F. T.; KRALJ, S.; OZIMEK, L. K.; DIJKHUIZEN, L.; VAN GEEL-SCHUTTEN, I. G. H. Structural–function relationships of glucansucrases and fructan enzymes from lactic acid bacteria. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 70, p.157-176, 2006.

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

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

WELMAN, A. D.; MADDOX, I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 6, p 269-274, 2003.

### **CAPÍTULO III**

## **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTI-INFLAMATÓRIO PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE DO COMPOSTO BIOATIVO A BASE DE POLISSACARÍDEO E PROTEÍNAS OBTIDO DO KEFIR TIBETANO**

### **RESUMO**

Atualmente existe uma procura muito grande por novas moléculas que possuem atividades biológicas, e neste intuito que setores de pesquisa e desenvolvimento de diferentes indústrias e área acadêmica têm intensificado a busca por estas moléculas, extratos e produtos de fermentação. A avaliação da atividade angiogênica e anti-inflamatória é de suma importância, pois substâncias que possuam estas atividades e sejam seguras podem ser usados em diferentes produtos. O presente trabalho objetivo avaliar a atividade angiogênica e anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase do extrato composto por polissacarídeo e proteína (ExPP) liofilizado obtido da fermentação do kefir tibetano em soro de leite suplementado. Na avaliação da atividade angiogênica deste extrato foi possível confirmar que ele é uma substância pró angiogênica com bons resultados na estimulação de novos vasos sanguíneos. Quanto à atividade anti-inflamatória o ExPP liofilizado apresentou uma ação inibidora da enzima hialuronidase excelente sendo superior ao produto comercial comparado. E o ExPP liofilizado apresentou segurança quanto a citotoxicidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** Kefir tibetano, atividade angiogênica, atividade anti-inflamatória, hialuronidase.

## 1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos vêm sendo realizados com diferentes moléculas, extratos e produtos de fermentação com o intuito de descobrir e confirmar alguma atividade biológica de interesse e que possa ser utilizado no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, cosmecêuticos ou nutracêuticos.

Os primeiros estudos sobre a angiogênese foram propostos por Folkman (1971), aplicando o conceito de controle de leito vascular – estimulação ou inibição de novos vasos na tentativa de elucidar este processo e também como uma alternativa terapêutica para diversas condições clínicas.

Em geral nos indivíduos adultos saudáveis, as células endoteliais que revestem o lúmen dos vasos sanguíneos encontram-se quiescentes, apresentam atividade mitogênica próxima de zero, e a neoformação vascular é virtualmente ausente. Porém, quando estas células são estimuladas tem-se início a neoformação vascular. A neoformação vascular ocorre por dois mecanismos distintos: a vasculogênese e a angiogênese (LAMALICE *et al.*, 2007; ADANS e ALITALO, 2007). A vasculogênese é responsável pela formação dos primeiros vasos na fase embrionária em animais.

A angiogênese é a formação de uma nova vasculatura a partir de vasos preexistentes, tais como vênulas e capilares, isto acontece por brotamento ou intussuscepção (divisão de vasos por meio de prolongamento da parede vascular) (DIAS *et al.*, 2002; ADANS e ALITALO, 2007). Para que ocorra a angiogênese é necessário um estímulo tecidual que induza o aumento da expressão de fatores pró angiogênicos como o VEGF e o FGF. O principal estímulo endógeno para este processo é hipóxia tecidual, o que induz as células endoteliais a passarem do estado mitoticamente quiescente para ativo e todo o processo tem início (FOLKMAN, 1987; DIAS *et al.*, 2002; ADANS e ALITALO, 2007).

A angiogênese é fundamental para o reparo e o desenvolvimento de tecidos, como na cicatrização, desenvolvimento da circulação colateral em tecidos isquêmicos, na formação de corpo lúteo, endométrio, placenta e crescimento de cabelo, nestes casos a angiogênese é denominada fisiológica e é rigidamente controlada e transitória. Mas pode também estar associada a quadros patológicos como neoplasias e alterações oculares (FOLKMAN, 1987; DIAS *et al.*, 2002; ADANS e ALITALO, 2007).

O processo inflamatório é constituído por uma série de eventos que estão relacionados com uma lesão tecidual ou a uma infecção. Após uma lesão imediatamente se inicia o processo de reparação envolvendo várias substâncias moleculares e celulares. A inflamação, proliferação celular e remodelagem dos tecidos são fases, nas quais ocorrem síntese e degradação da matriz extracelular envolvendo a ativação e inibição hialuronidase (DELVES *et al.*, 2001).

A hialuronidase é uma enzima que tem a capacidade de hidrolisar o ácido hialurônico, um polímero viscoso, que geralmente localiza-se no interstício celular. O ácido hialurônico tem a propriedade de manter as células aderidas umas às outras. Assim, por ação da hialuronidase, o polímero é transformado em pequenos fragmentos, diminuindo significativamente sua viscosidade e facilitando a proliferação celular entre os tecidos, levando assim a uma conseqüente degradação da matriz extracelular, favorecendo o processo inflamatório (BORNSTEIN e SAGE, 2002).

Com um enfoque na possibilidade da hialuronidase ser inibida por drogas, métodos imunológicos ou pela utilização de inibidores naturais é que muitos trabalhos foram desenvolvidos, nesses estudos destaca-se a avaliação de compostos fenólicos, flavonoides e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois entre outros (JEONG *et al.*, 2000; SALMEN, 2003).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade angiogênica e anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase do extrato composto por polissacarídeo e proteína obtido por fermentação do kefir tibetano em soro de leite.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA

O composto bioativo a base de polissacarídeo e proteína (ExPP) foi obtido a partir da fermentação do kefir tibetano em soro de leite doce desnatado da seguinte forma:

O soro de leite doce desnatado foi enriquecido com 30% de glicose (p/v), 2% de peptona bacteriológica (p/v), 4% de fosfato de potássio monobásico e 4% de citrato de sódio diidratado, e pasteurizou-se o meio de fermentação a 63°C por 30 minutos. Após a pasteurização o meio foi inoculado com 6% da cultura de kefir tibetano (p/v) com uma contagem de  $10^8$  UFC g<sup>-1</sup> de BAL e  $10^8$  UFC g<sup>-1</sup> de leveduras, o tempo de fermentação foi de 48 h a 37°C.

Ao término da fermentação, o fermentado foi filtrado e centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi tratado com solução de TCA 10% e novamente centrifugado nas mesmas condições. O precipitado foi descartado e o sobrenadante tratado com etanol absoluto a 4°C na proporção de 1:3 e deixado em repouso à temperatura de 4°C por 24 h, após o tempo de precipitação o material foi centrifugado nas mesmas condições e novamente precipitado. Depois de precipitado e centrifugado o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em água destilada e dializado em membrana de dialise de 10-12 kDa por 72 h contra água destilada. O material dializado foi congelado e liofilizado (*freeze-dryer*, Modulyo<sup>R</sup>, Thermo Electron) e armazenado a temperatura ambiente.

### 2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA

A avaliação da atividade angiogênica foi realizada nos laboratórios do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe em Curitiba. Por se tratar de pesquisa com modelos animais, um projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA-UFPR) e aprovado sob o número 23075.047773/2010-61.

A avaliação *in vivo* do processo de angiogênese foi realizado utilizando ovos de galinha (*Gallus gallus*) embrionados nos quais foram observados a formação de

rede vascular na membrana corioalantócia (CAM-assay), de acordo com o método *ex-ovo* proposto por BOLLER (2013).

Modelo Biológico – foram utilizados ovos de galinha da espécie *Gallus gallus*, de tamanho padrão médio (entre 60-70 g), fertilizados e livres de patógenos específicos, os ovos foram fornecidos por uma empresa especializada em avicultura da região metropolitana de Curitiba. Esse material foi estocado a uma temperatura de 18-22° C, por até no máximo 48 horas.

Os ovos após terem sido selecionados foram incubados em incubadora de ovos comerciais (Chocmaster CHM 240) com temperatura de 37°C e 60% de umidade, por 3 dias com a utilização de luz UV durante 1h a cada 12 h. Depois deste primeiro período de incubação os ovos foram abertos sob fluxo laminar unidirecional (Veco) e transferidos para placa de cultivo celular contendo barquinha estéril (FIGURA 1A). Neste ponto, os embriões são classificados como estágio HH 20 (HAMBURGER e HAMILTON, 1992). As placas contendo os embriões foram novamente incubados por 10 dias nas mesmas condições. Após o tempo de incubação as placas foram abertas sob fluxo laminar (FIGURA 1B), cada placa contendo o embrião recebeu 3 discos de celulose de 6 mm, impregnados com o ExPP L nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 e 3000 ng/mL e dispostos ao longo da membrana corioalantóica (CAM) (FIGURA 1C). Como controle positivo foi utilizado o fator pró-angiogênico o VGEF (Sigma-Aldrich®) e como controle negativo o fator anti-angiogênico hidrocortisona (Sigma-Aldrich®). Para todas as substâncias testadas foram trabalhadas com n=6 e para avaliar as condições normais de desenvolvimento da angiogênese no embrião foi testado disco de celulose impregnado somente com PBS esterilizado. Em seguida as placas com os embriões e os discos foram novamente incubados por 2 dias nas mesmas condições.

Ao final do último período de incubação (FIGURA 1D), as placas contendo os embriões com os discos foram retirados da incubação e cada disco foi fotomicrografado, a fim de que se realiza a contagem dos vasos sanguíneos em torno de cada disco. Este processo de fotomicrografia foi realizado com auxílio de contraste composto por solução de 30% de leite em pó injetado dentro do alantoide (FIGURA 1E e 1F). As microfotografias foram analisadas com o auxílio do programa ImageJ®.

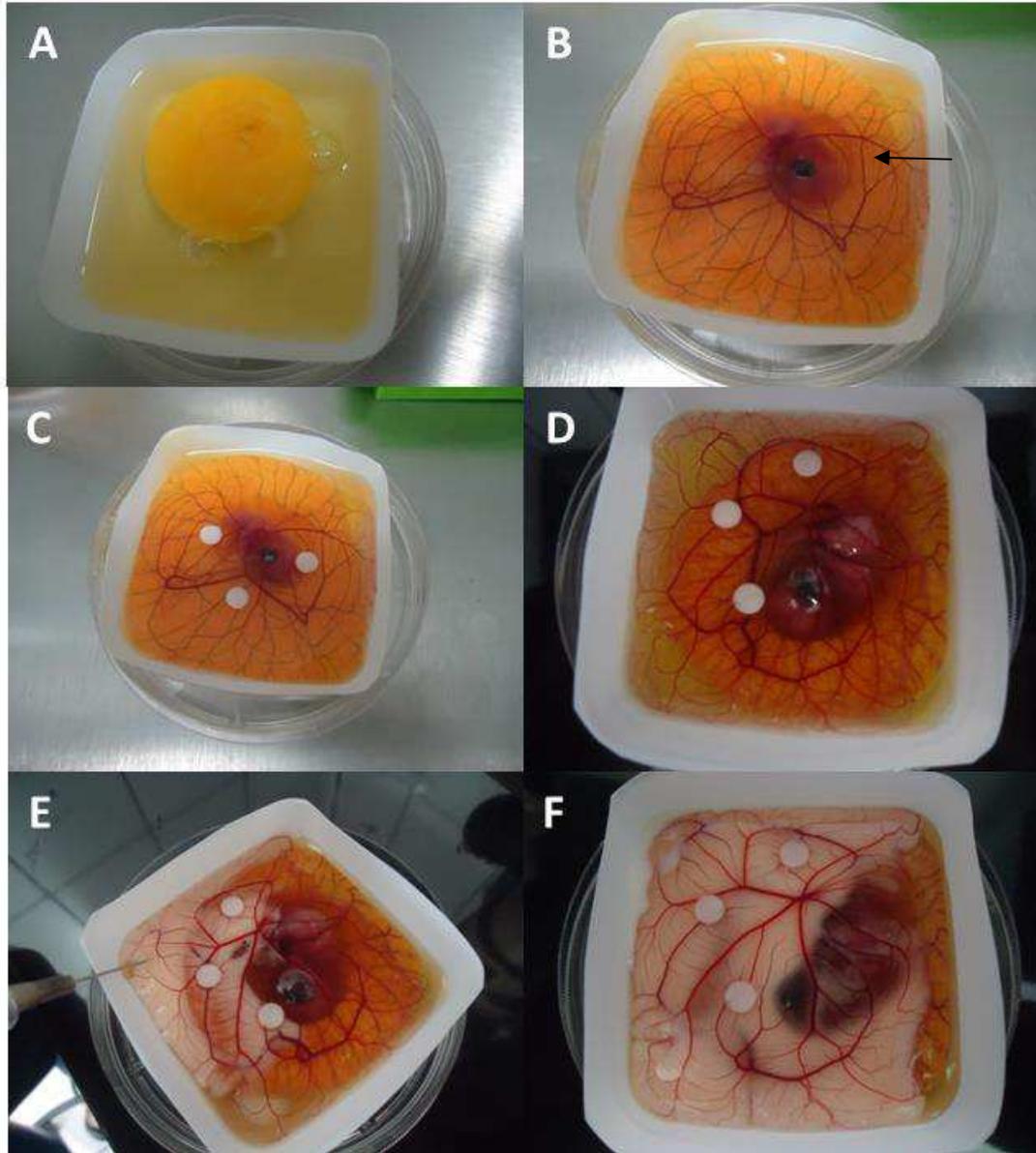


FIGURA 1. ESQUEMA DE FOTOS DEMOSTRANDO A METODOLOGIA *EX-OVO* PARA AVALIAR A ANGIOGÊNESE.

A) Transferência para placa de cultivo celular do embrião com três dias de incubação. B) Embrião com 13 dias de incubação, na seta é possível observar as redes de vasos que formam a membrana corioalantóica (CAM). C) Foram colocados três discos contendo a amostra, os discos foram espalhados sobre a CAM. D) Embrião após 15 dias de incubação e dois dias com os discos. E) Injeção do contraste dentro do saco de CAM. F) O contraste se espalha dentro do alantóide e os discos foram fotomicrografados na sequência, é possível observar que o embrião permanece vivo permitindo a contagem dos vasos ao redor do disco.

### 2.2.1 Análise da atividade angiogênica

Todos os resultados em número de vasos sanguíneos foram analisados em concentração estimulatória de 50% (EC 50) ou concentração inibitória de 50% (IC 50), com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

### 2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE

Para avaliar a atividade anti-inflamatória com a inibição da enzima hialuronidase foi utilizado o método *in vitro* de acordo com Reissing (1955), Aronson e Davidson (1967) e Kuppusamy *et al.* (1990).

Foram utilizadas amostras do extrato precipitado (ExPP Pt) com etanol absoluto na proporção de 1:3, extrato dializado (ExPP D) por 72 h contra água destilada, extrato congelado (ExPP C) à -80°C e extrato liofilizado (ExPP L). Também foi testado um produto comercial natural composto por extrato etanólico de própolis, com o intuito de comparar a atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase deste produto com o extrato composto de polissacarídeo e proteína.

Para a análise das amostras, foram adicionados 50 µL de cada amostra com diferentes concentrações previamente definidas e 0,5 ml da solução de ácido hialurônico (Sigma-Aldrich®) (1,2 mg de ácido hialurônico por mL de solução tampão acetato 0,1 M, pH 3,6, contendo NaCl 0,15 M) nos tubos de reação e controle. Os tubos foram incubados a 37°C por 5 minutos, em seguida foi adicionado 50 µL de enzima hialuronidase (350 unidades da enzima hialuronidase tipo IV - S a partir de testículos de bovino, Sigma-Aldrich®) dissolvida no mesmo tampão de substrato (concentração de 6,5 mg/mL) e incubadas a 37 ° C por 40 min. A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de uma solução de hidróxido de sódio 4N, imediatamente colocou-se 0,1 mL de solução 0,8 M de tetraborato de potássio e incubou-se em banho fervente durante 3 minutos. Após o tempo de incubação adicionou-se 3 mL de *p* - dimetilaminobenzaldeído (DMAB) (solução a 10 % em ácido acético glacial contendo 12,5% de ácido clorídrico 10N) e novamente incubado a 37° C durante 20 minutos. Em seguida, as amostras foram medidas em

espectrofotômetro (SP-2000 UV Spectrum) em 585 nm. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

### **2.3.1 Análise da atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase**

Para analisar a atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase das amostras foram determinado a concentração inibidora (IC50), com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

## **2.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE**

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com células Vero de epitélio renal de *Cercopithecus aethiops* (macaco verde africano), gentilmente doadas pelo Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR (ANEXO 2). Este ensaio foi realizado nos laboratórios do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe em Curitiba.

### **2.4.1 Células Vero**

A linhagem celular foi mantida em estufa à 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> com meio DMEM-High glicose (Dubelcos Modified Essential Medium-LGC) suplementado com 1% antibiótico P/S (penicilina 100 ug/ml e Streptomina 0,1 mg/ml) e 10% de FBS (Fetal Bovine Serum). A propagação celular foi realizada bi-semanalmente, sempre que as células apresentavam uma boa confluência e morfologia (confirmada por microscopia óptica). Brevemente, removeu-se o meio de cultura, lavando-se as células com PBS (Phosphate Buffered Saline) e colocando-se na câmara de culturas com 0,5% tripsina-EDTA durante cinco minutos, com o objetivo de desprender as células da superfície de crescimento do frasco. Na sequência, ressuspendeu-se com meio de cultura renovado contendo 10% de FBS para a inativação da tripsina, em seguida as mesmas foram contadas e diluídas na concentração de 1x10<sup>3</sup> células por cm<sup>2</sup> do frasco de cultivo. Ressalta-se que todos

os reagentes foram sempre pré-aquecidos a 37°C de modo a evitar o estresse celular provocado pela diferença de temperatura.

Adicionalmente, procedeu-se ao congelamento das células para manter um estoque celular para ensaios posteriores. Para tal, inocularam-se as células em frascos de 80 cm<sup>3</sup> e, após atingirem a fase de crescimento exponencial, removeu-se o meio, lavaram-se as células com PBS, tripsinizaron-se e ressuspenderam-se em meio fresco. Após centrifugação de 10 minutos a 400g, o sobrenadante foi descartado e foram ressuspensas em 800 µL de SFB e 100 µL de meio de cultivo. As células foram então transferidas para um criotubo em que foram adicionados 100 µL de DMSO (Sigma-Aldrich®). Os criotubos foram colocados em um equipamento de congelamento programável (Nicoool Lm10; Air Liquide, Marne La Vallée, France), obedecendo a um programa, com os seguintes níveis de temperatura e tempo. Após, as amostras foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido (DE UGARTE *et al.*, 2003).

Para descongelar as amostras, as mesmas foram retiradas do botijão de nitrogênio líquido, e o descongelamento foi realizado em banho termostático a 37°C. Após esta etapa, as células foram ressuspensas em meio de cultivo DMEM-High glicose suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S e centrifugadas por 10 minutos a 400 g. O processo de descongelamento das células contidas no criotubo até a ressuspensão no meio teve a duração média de 3 minutos.

#### **2.4.2 Cultivo e expansão das células Vero**

Após 72 horas de cultivo, o meio foi aspirado e as células lavadas com PBS pré-aquecido com 1% de antibiótico P/S (penicilina 100 u/ml e Streptomina 0,1 mg/ml). Em seguida, foi adicionado 7 mL de Alpha-MEM e as células mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada três dias até 75% de confluência. Após atingirem a confluência desejada, as células foram lavadas brevemente com PBS pré-aquecido e adicionado 3 mL de tripsina/EDTA (0,05%) (GIBCO BRL) por garrafa, incubadas por 5 minutos à 37°C para que estas se desprendessem do frasco. Em seguida, foi adicionado a mesma quantidade de meio com 10% de SFB (3 mL) para neutralizar a ação da tripsina. A suspensão de células foi transferida para um tubo de centrífuga estéril de 15 mL e centrifugado a 400 g por

5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em aproximadamente 5 ml de meio de Alpha-MEM suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina e 1% de P/S. A contagem das células foi realizada com um hemocítmetro utilizando Azul de Trypan (BUNNELL *et al.*, 2008).

### **2.4.3 Teste de Viabilidade Celular por MTT**

As células foram contadas e semeadas ( $1 \times 10^3$  células/poço) em placas de 96 poços após serem tripsinizadas, até obter culturas semiconfluentes. Após 24 h de incubação, o meio de cultivo foi removido e 100  $\mu$ L de meio de cultura contendo, isoladamente, diluições seriadas da amostra de ExPP L, nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 e 3000 ng/mL. As células foram mantidas em estufa á 37°C em 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. O controle negativo foram células não tratadas, mantidas em incubação pelo mesmo tempo que as tratadas.

Para verificar a viabilidade celular após os tratamentos, foi retirado o sobrenadante e os poços lavados com PBS. Fez-se uma solução 0,5 mg/ml de MTT em meio de cultura. Esta solução foi adicionada aos poços (100  $\mu$ L por poço) e as placas mantidas novamente em estufa á 37°C por 3 horas.

O sobrenadante foi retirado, lavado com PBS. Adicionou-se 100  $\mu$ L de DMSO por poço mantendo-se em agitação por 5 minutos. A leitura foi feita em leitor de placa de ELISA a 590 nm.

### **2.4.4 Análise da citotoxicidade**

Para analisar a citotoxicidade da amostra foi determinado a concentração citotóxica (CC50), comparando todas as concentrações com o controle negativo, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar estatisticamente os resultados foram submetidos ao teste de normalidade, a análise de variância (ANOVA) e seguidos de pós-teste utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

### 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA

Este ensaio foi avaliado sobre o processo de angiogênese da membrana corioalantóica (MC) em embriões de *Gallus gallus* considerando a vascularização formada a partir dos vasos pré-existente. A determinação da modulação angiogênica das substâncias foi realizada por meio da quantificação dos vasos sanguíneos da MC que interceptaram os discos de celulose.

As fotomicrografias dos discos com as amostras foram tratadas pelo programa ImageJ<sup>®</sup> (FIGURA 2) e realizado a contagem dos vasos que interceptam o disco com a substância em teste.

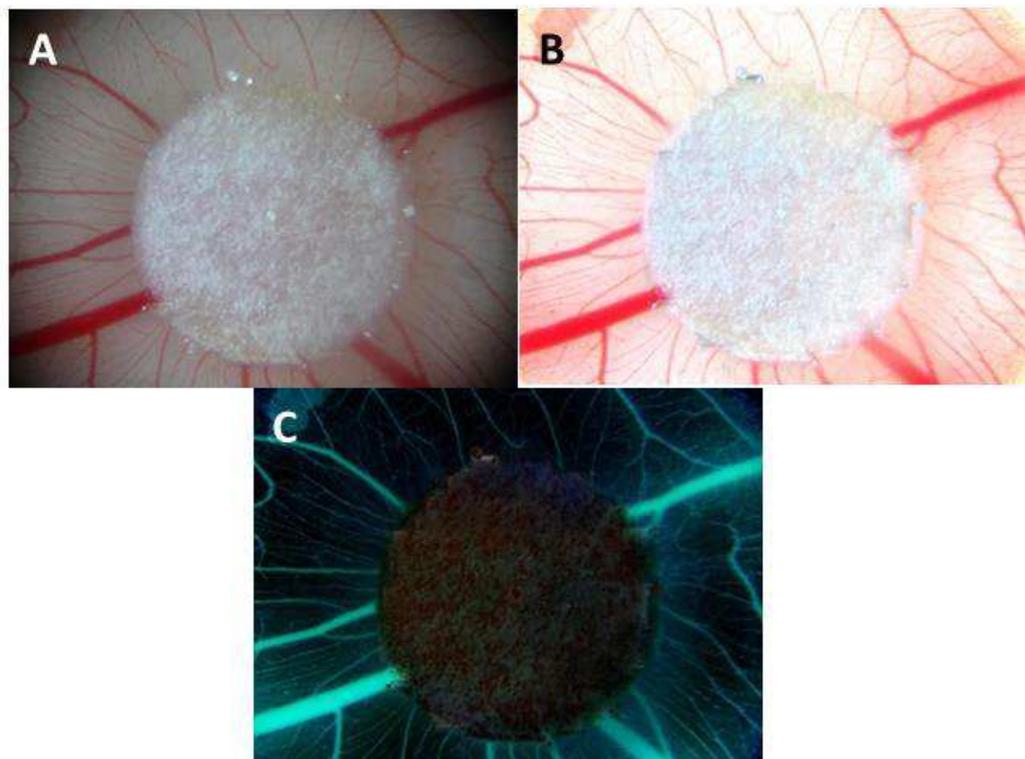


FIGURA 2. ESQUEMA DE FOTOMICROGRAFIAS DEMONSTRANDO O TRATAMENTO DA IMAGEM PELO PROGRAMA IMAGEJ<sup>®</sup>.

A) Fotomicrografia sem o tratamento de imagem. B) fotomicrografia após o primeiro tratamento de imagem é possível observar com maior nitidez os vasos sanguíneos. C) fotomicrografia após o segundo tratamento de imagem pelo programa ImageJ<sup>®</sup> é possível visualizar os vasos sanguíneos e realizar a contagem.

O efeito de uma substância, pode ser descrito por parâmetros que permitam inferir sobre sua eficácia e potência, quantificando a relação dose-resposta ao efeito de modulação angiogênica do ExPP L, dos controles VEGF e hidrocortisona no teste de CAM-assay. A curva concentração-efeito foi obtida pela contagem dos vasos que interceptaram os discos com as substâncias em teste. A relação foi ajustada por uma função sigmoide para estimar a EC50 que é a concentração que induz 50% de efeito máximo do ExPP L e do VEGF, para a hidrocortisona foi estimado a concentração inibitória (IC50).

Para o ExPP L foi encontrado uma EC50 de 192 ng/mL com uma margem de aceitação para o nível de 95% de confiança de 152 ng/mL a 242,6 ng/mL. Na FIGURA 3 o valor de EC50 foi demonstrado pelo log da concentração inferida no valor de 2,283 ng/mL.

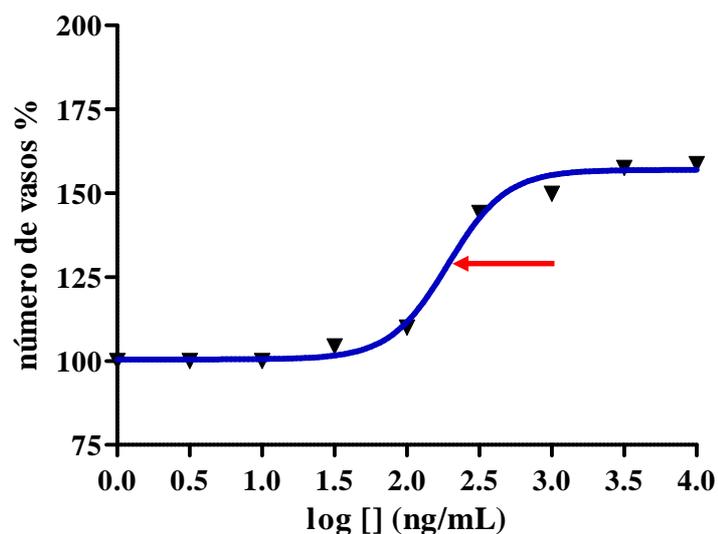


FIGURA 3. DETERMINAÇÃO DA EC50 PARA O ExPP L

Na seta foi demonstrado a EC50 para o ExPP L, obtida a partir da curva de regressão não linear de cada dose do ExPP L.

log [ ] – logaritmo da concentração.

Na determinação da EC50 para o VEGF foi encontrado uma dose-resposta de 5,562 ng/mL com um log EC50 de 0,7453 ng/mL (FIGURA 4), avaliando o nível de confiança de 95% a margem da dose-resposta para o VEGF foi de 3,496 ng/mL a 8,850 ng/mL.

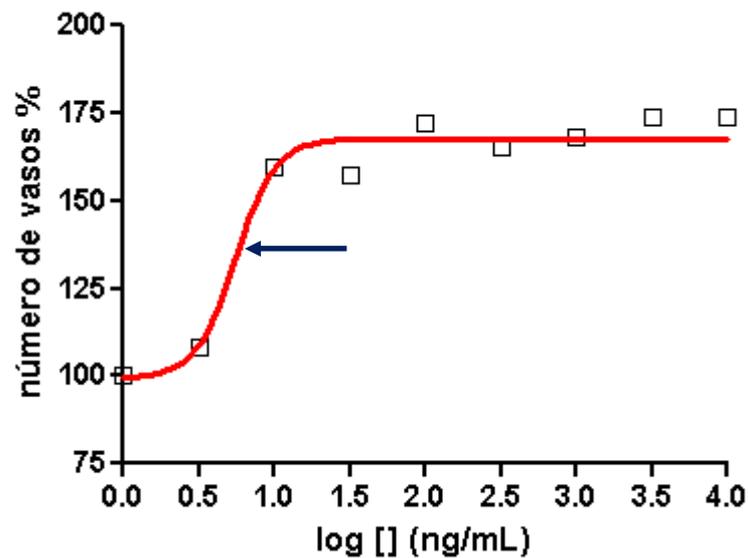


FIGURA 4. DETERMINAÇÃO DA EC50 PARA O VEGF.

Na seta foi demonstrado a EC50 para o VEGF, obtida a partir da curva de regressão não linear de cada dose testada.

log [ ] – logaritmo da concentração.

Para avaliar a atividade moduladora da angiogênese em relação à dose-resposta do ExPP L e do VEGF, os valores encontrados foram plotados no mesmo gráfico (FIGURA 5), sendo possível afirmar que o VEGF, o qual é um potente agente pró-angiogênico utilizado como padrão de referência, tem uma dose-resposta aproximadamente 2.700 vezes mais efetivo que o ExPP L.

No entanto o ExPP L pode ser considerado um bom agente pró-angiogênico, pois ele estimulou a formação de neovasos em uma porcentagem próxima ao VEGF. Ainda observa-se para o ExPP L que a partir da concentração de log 1,5 ng/mL o aumento de vasos é crescente com uma excelente dose-resposta no intervalo de log de EC50 entre 2,182 ng/mL e 2,385 ng/mL, e depois da concentração de log de 3,0 praticamente não ocorreu um incremento na formação de neovasos. Ainda é possível afirmar que apesar de EC50 diferentes para o VEGF e para o ExPP L, quando se atinge a EC50 para cada um deles a porcentagem de formação de vasos é bem próximo com 170 % para o VEGF e 160% para o ExPP L, o que confirma a atividade moduladora da angiogênese como um pró-angiogênico para o ExPP L.

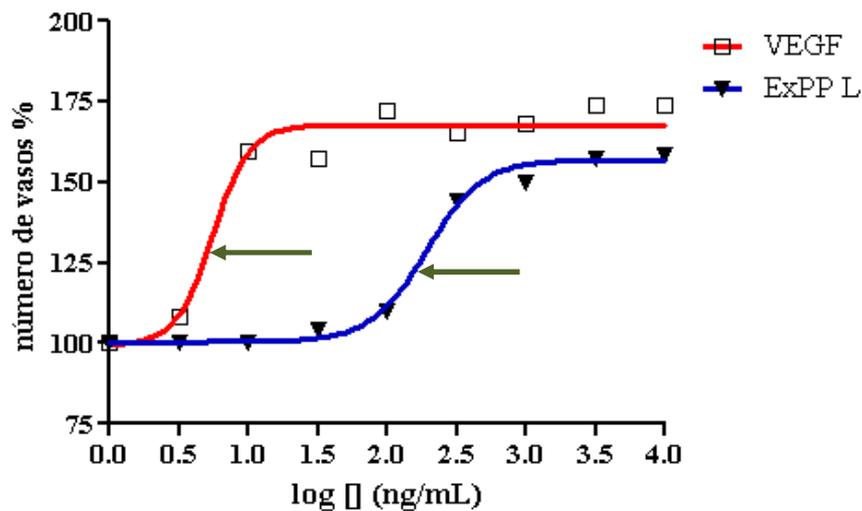


FIGURA 5. COMPARAÇÃO ENTRE A CURVA-RESPOSTA PARA O VEGF E O ExPP L. Nas setas observa-se o log EC50 para o VEGF e para o ExPP L, obtidas a partir da curva de regressão não linear de cada dose testada. log [C] – logaritmo da concentração.

O resultados dos números de vasos formados pelo ExPP L e pelo VEGF nas diferentes concentrações testadas, também foram analisados pela análise de variância (ANOVA) com 95% de nível de confiança ( $p < 0.05$ ) e com pós-teste de Bonferroni. Nesta análise observa-se que existe diferença estatisticamente significativa entre os logs das concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 ng/mL do ExPP L e VEGF, e para as demais concentrações não existe diferença significativa (FIGURA 6). Para o VEGF são nestas concentrações que ocorre a maior formação de vasos sanguíneos.

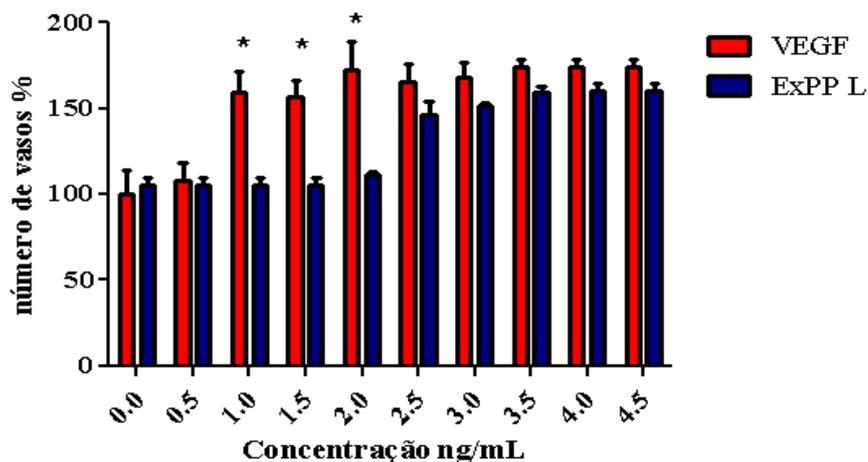


FIGURA 6. COMPARAÇÃO ENTRE OS LOGS DAS CONCENTRAÇÕES DE VEGF E ExPP L.

\* representa a diferença estatisticamente significativa ao nível de  $p < 0,05$  entre os logs das concentrações de VEGF e ExPP L (ANOVA seguido de Bonferroni).

O hidrocortisona é um corticoide exógeno com atividade anti-angiogênica, ou seja, reduz a formação de vasos sanguíneos, esta substância foi testada como um controle negativo de angiogênese com o intuito de avaliar o comportamento do ExPP L. Para realizar esta avaliação foram utilizadas as concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 e 3000 ng/mL e a curva concentração-efeito foi obtida pela contagem dos vasos que interceptaram os discos. A relação foi ajustada por uma função sigmoide para estimar o IC50 que é a concentração que induz 50% de inibição máxima de formação de novos vasos. A FIGURA 7 demonstra a dose-efeito do hidrocortisona em relação a formação de vasos, sendo possível observar uma drástica redução de novos vasos com o aumento da concentração de dose testada, e a IC50 é de aproximadamente de 1.222 mg/mL.

Analisando a FIGURA 8 observa-se um comportamento bem distinto entre o ExPP L e o hidrocorticoide em relação a porcentagem do número de novos vasos, confirmando o comportamento anti-angiogênico do hidrocorticoide e o comportamento pró-angiogênico do ExPP L em relação a atividade moduladora de angiogênese.

Estes dados permitem inferir que o ExPP L apresenta uma atividade angiogênica e não apresenta atividade antiangiogênica.

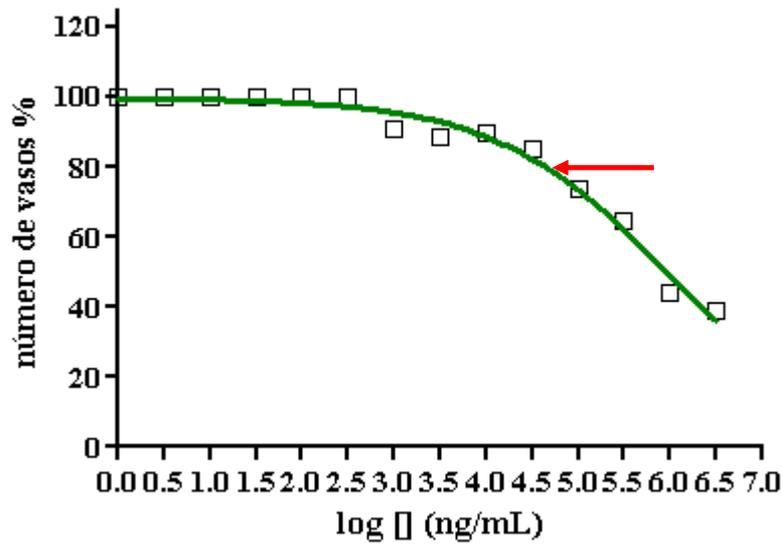


FIGURA 7. DETERMINAÇÃO DA IC<sub>50</sub> PARA O HIDROCORTICÓIDE.

Na seta foi demonstrado a IC<sub>50</sub> para o hidrocorticoide, obtida a partir da curva de regressão não linear de cada dose testada.

log [C] – logaritmo da concentração.

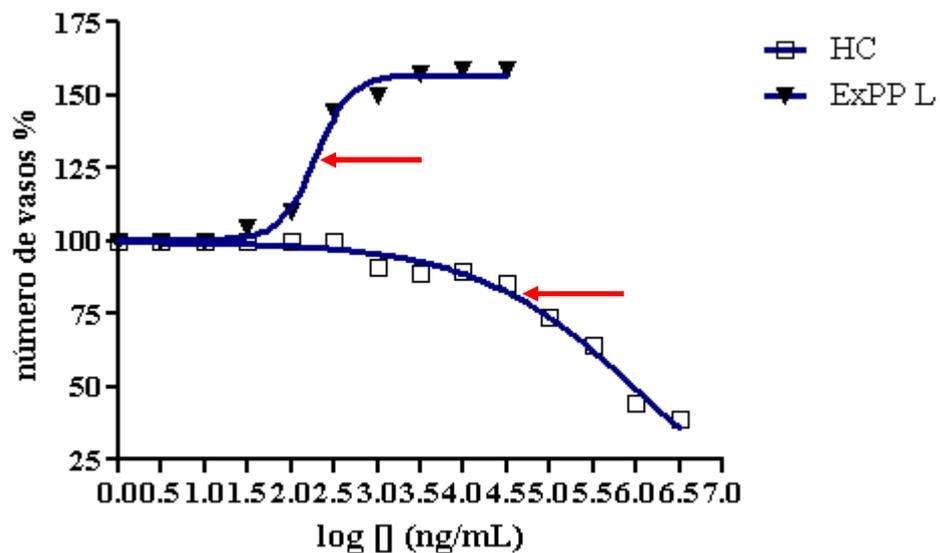


FIGURA 8. COMPARAÇÃO ENTRE A CURVA-RESPOSTA PARA O ExPP L E O HIDROCORTICÓIDE.

Nas setas observa-se a EC<sub>50</sub> para o ExPP L e a IC<sub>50</sub> para o hidrocorticoide (HC), obtidas a partir da curva de regressão não linear de cada dose testada.

log [C] – logaritmo da concentração.

### 3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE

O composto bioativo de polissacarídeo e proteína (ExPP) foi primeiramente testado em diferentes formas de apresentação com o intuito de avaliar a melhor resposta anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase. Foram estudados os ExPP precipitado com etanol, ExPP liofilizado, o ExPP dializado por 72 h contra água e o ExPP congelado a - 80°C todos foram testados na concentração de 5 mg/mL, também utilizou-se um controle positivo DMSO na mesma concentração, o qual tem a capacidade de inibir 100% a enzima hialuronidase.

Os resultados obtidos foram analisados pela análise variância (ANOVA) com 95% de nível de confiança ( $p < 0.05$ ) e com pós-teste de Tukey avaliando as amostras entre si. A FIGURA 9 demonstra a atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase das amostras comparadas com o DMSO.

Os ExPP apresentaram uma boa resposta em relação a atividade anti-inflamatória, comparando o ExPP L (63% de atividade) com o ExPP D (61% de atividade) é possível avaliar que não existe diferença significativa a nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ) entre eles, entretanto, o ExPP L é mais estável por não conter água e mantém a atividade anti-inflamatória por mais tempo. Analisando os ExPP Pt (45% de atividade) e o ExPP C (45% de atividade) quando comparados com o ExPP L mostraram diferença altamente significativa a nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ).

Comparando as atividades dos ExPPs com o DMSO é possível observar que existe diferença significativa entre eles, mas que o ExPP L tem uma atividade um pouco melhor que os demais ExPP e também apresenta-se mais estável.

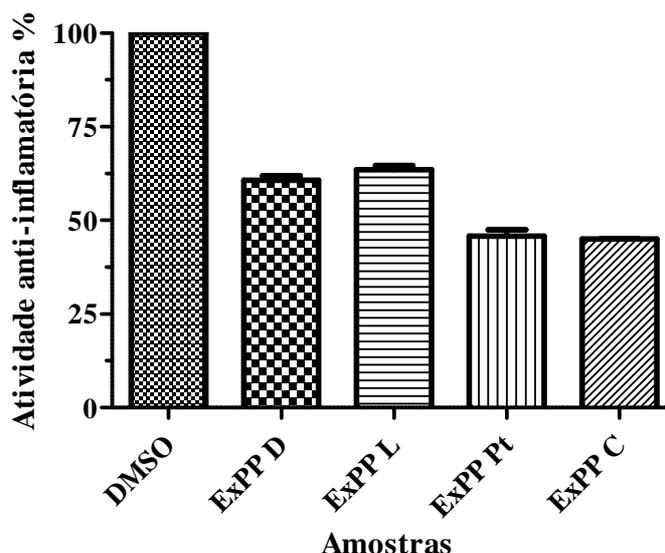


FIGURA 9. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE DE DIFERENTES EXTRATOS DE POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA. DMSO dimetil sufóxido, ExPP D extrato de polissacarídeo e proteína dializado, ExPP L extrato de polissacarídeo e proteína liofilizado, ExPP Pt extrato de polissacarídeo e proteína precipitado e ExPP C extrato de polissacarídeo e proteína congelado.

O ExPP L foi escolhido como a melhor forma de apresentação em relação a atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase, e este extrato foi testado nas concentrações de 1mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 5 mg/mL, 7 mg/mL e 8 mg/mL para definir a melhor concentração inibitória da enzima hialuronidase e por consequência do processo inflamatório. Os resultados foram analisados e demonstrados na FIGURA 10 as concentrações trabalhadas foram convertidas em log da concentração para que fosse possível identificar a concentração definida como a dose repostada inibidora (IC50), ou seja, a concentração que induz 50% de inibição máxima da enzima hialuronidase com um valor mínimo de 2,08 mg/mL e máxima de 2,57 mg/mL.

DINIZ *et al*, 2003, estudaram a atividade anti-inflamatória do kefir tibete pelo método de edema de pata de ratos e foi usado uma suspensão do kefir tibete fermentado. Neste estudo foi observada uma redução de 43% do processo inflamatório, sugerindo um potencial terapêutico a suspensão fermentada do kefir como agente anti-inflamatório.

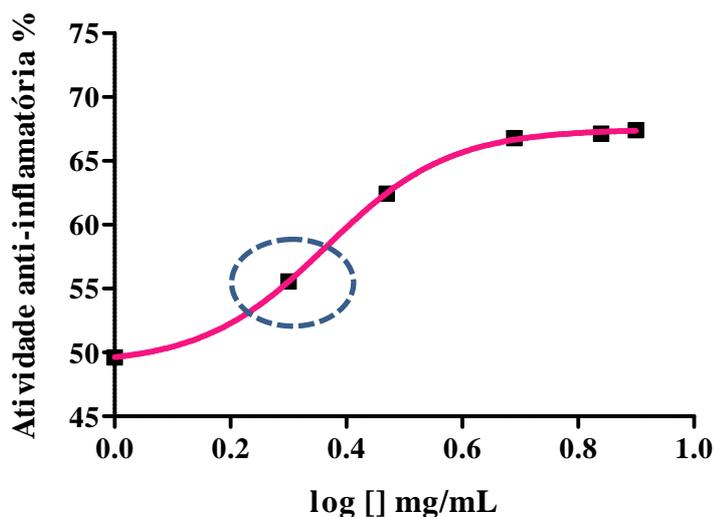


FIGURA 10. CURVA DOSE RESPOSTA INIBIDORA (IC50) DO ExPP L.

Mostra a atividade de inibição da enzima hialuronidase, obtida a partir da curva de regressão não linear de cada dose do ExPP L.

Tracejado mostra a região onde esta a IC50 para o ExPP L.

log [ ] – logaritmo da concentração.

Para obter resultados mais conclusivos em relação à capacidade inibidora da hialuronidase no processo inflamatório o ExPP L foi comparado com um produto comercial natural composto pelo extrato etanólico de própolis. Para esta avaliação o ExPP L foi testado nas concentrações de 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 5 mg/mL, 7 mg/mL e 8 mg/mL e o extrato etanólico de própolis comercial também foi avaliado nas mesmas concentrações. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey, comparando as atividades inibitórias da hialuronidase do ExPP L com as atividades inibitórias da hialuronidase do extrato etanólico de própolis.

Foram observadas diferenças significativas a 95% de nível de confiança em todas as concentrações testadas. O ExPP L apresentou uma atividade máxima de 67,1% na concentração de 7 mg/mL, e o extrato etanólico de própolis mostrou atividade máxima de 58% na concentração de 8 mg/mL, como foi demonstrado na FIGURA 11. PARK *et al.* (1998), estudaram várias concentrações do extrato etanólico de própolis e confirmaram que a concentração de 80 % (v/v) apresentou a maior inibição da enzima hialuronidase e portanto melhor atividade anti-inflamatória.

Avaliando os resultados encontrados para o ExPP L e para o extrato etanólico de própolis é observado que o ExPP L na concentração de 7 mg/mL tem a maior

resposta inibidora da enzima hialuronidase. Miyataka *et al.* (1997), relataram que a atividade da hialuronidase esta relacionada com o processo inflamatório em tecidos animais. Assim, a inibição desta enzima indica que o ExPP L testado possui atividade anti-inflamatória e pode ser considerado como um agente terapêutico.

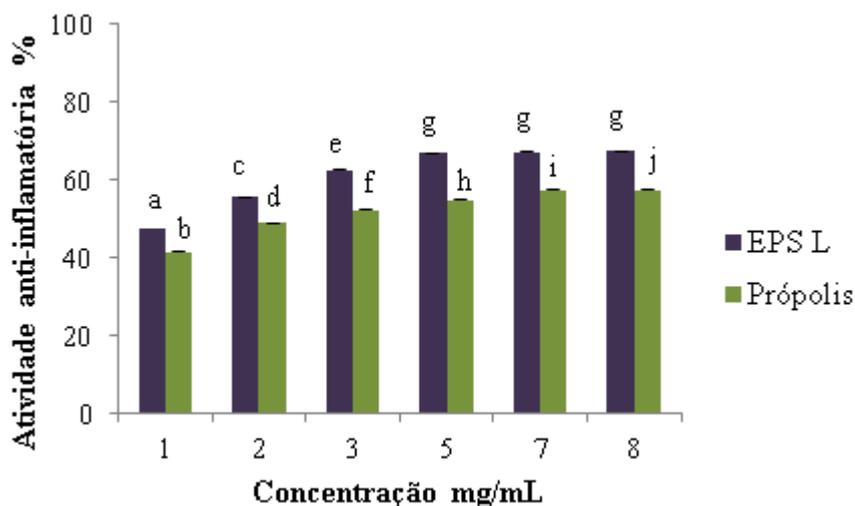


FIGURA 11. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ExPP L E DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS.

Letras iguais não diferem significativamente e letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

NARDONE (1977), defini a citotoxicidade como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que leva a uma série de modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas.

A citotoxicidade é um estudo de suma importância para verificar a toxicidade e segurança de uma substância que já esteja sendo pesquisada em relação à atividade biológica, e estes testes são realizados nos estágios iniciais do desenvolvimento de um novo produto que tenha ação terapêutica (WILSON, 2000; PUTNAM *et al.*, 2002).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são os mais utilizados e avalia-se a citotoxicidade basal, permitindo definir o limite de concentração tóxica as células

testadas. Em geral os métodos usados baseiam-se na alteração de permeabilidade celular por meio do uso de corantes, outro método muito utilizado avalia as funções mitocondriais este teste é realizado com o sal de tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2)2,5-difenil brometo de tetrazolium] (MTT). (WILSON, 2000; EISENBRAND *et al.*, 2002). O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais como as desidrogenases, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória e da viabilidade celular. A habilidade das células em reduzirem o MTT fornece uma indicação da atividade e da integridade mitocondrial, que são interpretadas como medidas da viabilidade celular (TODRYK, *et al.*, 2001; LIEBSCH e SPIELMANN, 2002).

O ExPP L foi avaliado quanto a citotoxicidade em cultivo de células Vero, nesta análise foram utilizadas as concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 e 3000 ng/mL do ExPP L. Os resultados foram analisados para se obter a curva concentração-efeito citotóxica em relação ao número de porcentagem de células viáveis mensurado pelo método espectrofotométrico. A relação foi ajustada por uma função sigmoide para estimar a concentração citotóxica que inibe o crescimento de 50 % de células (CC50), como foi possível avaliar na FIGURA 12 o ExPP L apresentou uma leve redução no crescimento celular, mas não o suficiente para definir a CC50 e afirmar que o ExPP L apresenta-se alguma dose-resposta com efeito citotóxico.

Foi possível observar que não existe relação dose-resposta quando avaliado a ação citotóxica do ExPP L, indicando que o mesmo não apresenta atividade citotóxica. Desta maneira, o ExPP L pode ser utilizado com segurança em relação a citotoxicidade.

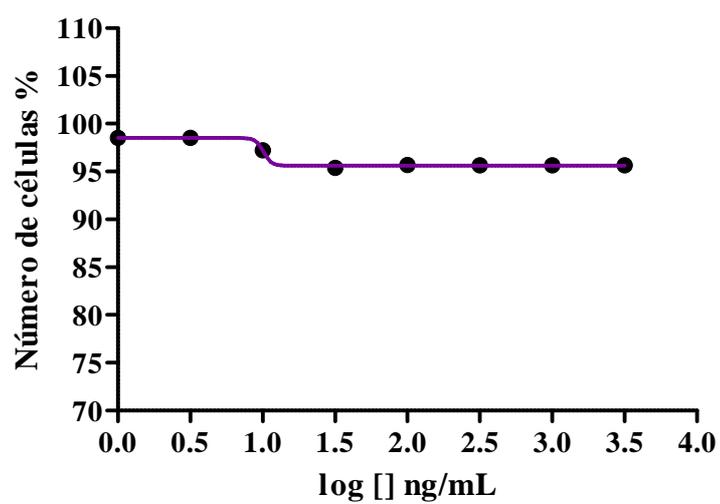


FIGURA 12. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ExPP L  
log [ ] – logaritmo da concentração.

#### **4. CONCLUSÃO**

O ExPP L pode ser classificado como um agente pró-angiogênico no processo de modulação da angiogênese, com um comportamento similar ao do VEGF. Em relação à atividade inibidora da hialuronidase no processo inflamatório o composto a base de polissacarídeo e proteína liofilizado apresentou uma boa ação inibidora da hialuronidase e quando comparado com um produto comercial ele teve uma ação superior o que permite o seu uso com este propósito. Ainda o composto a base de polissacarídeo e proteína liofilizado é um composto seguro em relação a citotoxicidade, o que permite o seu uso em diferentes formulações.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. H.; ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews**, v. 8, p. 464-478, 2007.
- AROSSOS, N. N.; DAVIDSON, E. A. Lysosomal hyaluronidase from rat liver. **The journal of biological chemistry**. v. 242, p. 441-444, 1967.
- BECHERER, J.D.; BLOBEL, C.P. Biochemical properties and functions of membrane-anchored metalloprotease-distintegrin proteins (ADAMs). **Curr. Top. Dev. Biol.** v. 54, p. 101-123, 2003.
- BOLLER, C. **Avaliação da atividade anti-angiogênica de extratos de *Chamomilla recutita* L., Asteraceae pela técnica adaptada de CAM ex ovo**. Curitiba, 2013. Tese (Biotecnologia aplicada a Saúde da Criança e do Adolescente) Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe.
- BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opin. Cell. Biol.** v. 14, n. 3, p. 608-616, 2002.
- BUNNELL, B. A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. **Methods**, v. 45, n. 2, p. 115–120, 2008.
- DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. Roitt's essential immunology. 12. ed. Oxford, UK: Wiley Black Well, 2011. 560 p.
- DE UGARTE, D. A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P. A.; ELBARBARY, A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H.; FRASER, J. K. Differential expression of stem cell mobilization-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. **Immunology letters**, v. 89, p. 267-270, 2003.
- DIAS, P.F.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; MARASCHIM, R.P.; MARASCHIM, M. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 25, p. 28-34, 2002.
- DINIZ, R.; GARLA, L. K.; SCHNEEDORF, J. M.; CARVALHO, J. C. T. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. **Pharm Res**. v. 47, p. 49-52, 2003.
- EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. **J. Med.**, v. 285, p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, p. 442-447, 1987.

JEONG, S. J.; KIM, N. Y.; KIM, D. H.; KANG, T. H.; AHN, N. H.; MIYAMOTO, T.; HIGUCHI, R.; HIM, Y. C. Hyaluronidase Inhibitory Active 6*H*Dibenzo[*b, d*]Pyran-6-Ones from the Feces of *Trogopterus xanthipes*. **Planta Med.** v. 66, n. 2, p. 76-77, 2000.

KUPPUSAMY, U.; KHOO, H.; DAS, N. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. **Biochem Pharmacol.** v. 40, n. 3, p. 397-401, 1990.

LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. **Circ. Res.** v. 100, p. 782-794, 2007.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. **Toxicology Letters.** v. 127, p. 127-134, 2002.

MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATOH, T. Evaluation of propolis. I: Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biol. Pharm. Bull.** v.20, p.496-501, 1997.

NARDONE, R.M. Toxicity testing in vitro. *In*: ROTBBLAT, G.H.; CRISTOFALO, V.J. **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, p. 471-495, 1977.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 18, 1998.

PUTNAM, K.P.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. **Toxicology In Vitro**, v. 16, p. 599-607, 2002.

REISSING, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **J. Biol. Chem.** v. 217, n. 2, p. 959-966, 1955.

SALMEN, S. **Inhibitors of bacterial and mammalian hyaluronidases**: synthesis and structure-activity relationships. University of Regensburg: Regensburg. 2003.

TODRYK, S.; MELCHER, A.; BOTTLEY, G.; GOUGH, M.; VILE, R. Cell death associated with genetic prodrug activation therapy of colorectal cancer. **Cancer Letters.** v. 174, p. 25-33, 2001.

WILSON, A. P. Cytotoxicity and viability assays. *In*: MASTERS, J.R.W. **Animal Cell Culture**. 3. ed. Oxford: University, 2000. p. 175-219.

## ANEXOS

## ANEXO 1



## TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Este Termo de Transferência de Material Biológico (TTM) foi instituído para a remessa de material biológico com base nas seguintes premissas:

- o reconhecimento de que o intercâmbio do material biológico realizado entre instituições de pesquisa nas áreas biológicas e afins, sediadas no Brasil e no exterior, é fundamental para o avanço no conhecimento;
- a garantia do cumprimento do disposto na legislação nacional, em especial, no consentimento prévio fundamentado e a repartição de benefícios, decorrentes do uso do material biológico em questão;
- o cumprimento às exigências e/ou restrições estabelecidas pelo depositante do material a ser remetido, quando houver.

**Dados do material transferido:**

Linhagem celular: VERO CCL-81  
 Passagem: 136  
 Referência: Livro Ata nr. 05 p. 33 - DVV/VARH  
 Meio de cultura: DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino  
 Apresentação: Garrafa de 150 cm<sup>2</sup>  
 Órgão: Rim  
 Morfologia: epitelial  
 Nome científico: *Cercopithecus aethiops*  
 Nome comum: Macaco verde africano

**Instituição remetente:**

Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR  
 Rua: João Américo de Oliveira, 330 - Curitiba-PR  
 Representante: Luciana Lopes Pedrosa  
 Cargo: Bióloga, Divisão de Vacinas Virais

**Instituição destinatária:**

Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe  
 Av. Silva Jardim, 1632 - Curitiba-PR  
 Representante: Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho  
 Cargo: Médica Pesquisadora

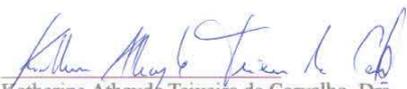
As instituições signatárias, acima qualificadas, por meio de seus representantes devidamente constituídos, comprometem-se a utilizar as amostras transferidas entre si de acordo com as seguintes condições:

1. A Instituição remetente não se responsabiliza pelo conteúdo de amostras repassadas a terceiros.
2. É vedada à instituição destinatária a utilização da linhagem cedida para fins de produção, sendo permitido o uso apenas em pesquisa básica.
3. Caso haja interesse em solicitação de patente a partir de amostra remetida com base neste

- Termo, a instituição destinatária obriga-se a comunicar o fato à instituição remetente.
4. É vedado o início das atividades mencionadas no item anterior sem a observância ao disposto na legislação vigente, em especial, a obtenção das autorizações específicas e da autorização, por escrito, emitida e assinada por representante legal da instituição remetente.
  5. Qualquer publicação nacional ou internacional advinda da utilização do referido material, deverá constar o nome da representante da instituição remetente, sempre vinculado a mesma.
  6. A instituição destinatária compromete-se a manter registros de toda a informação associada ao material remetido a partir do momento de seu recebimento, e responsabiliza-se pela veracidade e manutenção adequada da rastreabilidade destas informações.
  7. O descumprimento do disposto neste TTM implicará a aplicação das sanções previstas na legislação vigente.
  8. O foro competente para a solução de controvérsias entre as instituições envolvidas neste TTM será o da sede da instituição remetente.
  9. Os compromissos relativos ao material transferido por meio deste TTM permanecem válidos por tempo indeterminado, independente de sua renovação. Por concordarem com todos os termos acima expostos, os representantes da instituição destinatária e da instituição remetente, assinam o presente Termo em duas vias de igual teor e forma, para um só efeito legal.

Curitiba, 03 de maio de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Luciana Lopes Pedrosa, Msc.  
Bióloga, Divisão de Vacinas Virais  
Instituto de Tecnologia do Paraná

  
\_\_\_\_\_  
Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, Dra.  
Médica Pesquisadora  
Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe

## CAPÍTULO IV

### DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO COM EXTRATO COMPOSTO POR POLISSACARÍDEO E PROTEÍNA COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE

#### RESUMO

Atualmente o setor de desenvolvimento de novos produtos tem crescido muito, principalmente no que diz respeito a produtos com ação terapêutica, obtidos a partir de processos biotecnológicos. No desenvolvimento de produtos é necessário passar por várias etapas, entre elas esta o estudo da estabilidade das formulações. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma formulação contendo o ExPP L com ação anti-inflamatória, avaliar microbiologicamente e realizar o estudo de estabilidade deste produto. Foram desenvolvidos dois géis: gel 1ExPP L (gel não-iônico com hidroxietilcelulose) e gel 2ExPP L (gel aniônico com carbopol). Os dois géis foram avaliados quanto ao estudo de estabilidade, avaliação microbiológica, *Challenge test* e análise da atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase. Os dois géis apresentaram segurança quanto a presença de microrganismo contaminantes e também eficácia quanto ao sistema conservante. Em relação às características sensoriais os gel 1ExPP L apresentou-se mais pegajoso ao toque quando comparado ao gel 2ExPP L. As duas formulações demonstram estabilidade em diferentes temperatura em relação ao pH. Entretanto na avaliação da atividade anti-inflamatória ficou claro que as duas formulações são instáveis a temperatura de 40°C, e nas outras temperaturas testadas os géis são estáveis sem diminuir a atividade anti-inflamatória.

**PALAVRAS-CHAVE:** Desenvolvimento de produto, gel, extrato composto, atividade anti-inflamatória.

## 1. INTRODUÇÃO

Para o desenvolvimento de um novo produto, vários setores estão envolvidos, pois o estudo pode começar em laboratórios acadêmicos, bem como em laboratórios industriais. Sempre com o intuito de desenvolver novos produtos que atendam uma determinada faixa da população, aos conceitos de sustentabilidade, aos conceitos de produtos benéficos a saúde ou até mesmo produtos com ação terapêutica definida.

A pesquisa e desenvolvimento de produtos é um setor que requer conhecimento específico e condições de trabalho adequadas. De acordo com CUNHA e GOMES (2003), existem vários modelos de desenvolvimento de produtos sempre adaptados com a realidade empresarial ou ao mundo acadêmico. Entretanto, para o desenvolvimento de biomoléculas e a aplicação destas em um produto requer um estudo que contemple inúmeras etapas como demonstrado na FIGURA 1.

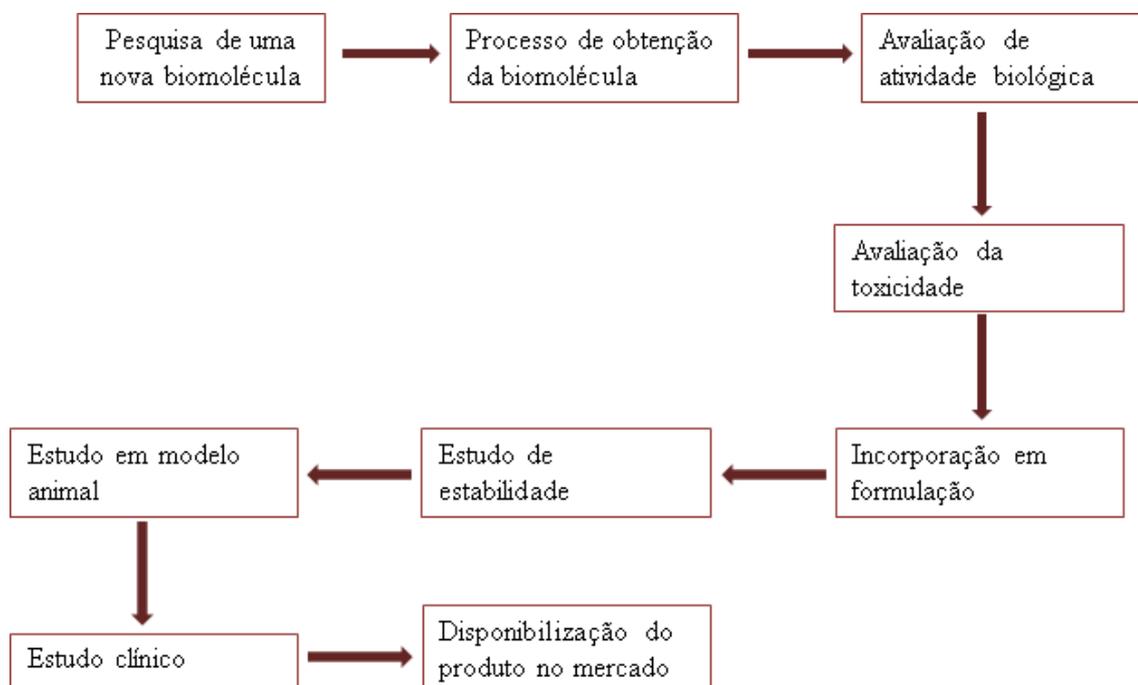


FIGURA 1. FLUXOGRAMA DE DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO COM BIOMOLÉCULA.

FONTE: O autor, 2014.

ALLEN *et al.* (2007), define gel como forma farmacêutica semi-sólida que possui grande quantidade de água em sua formulação, com característica geral a capacidade de adesão à superfície de aplicação e proporciona uma absorção rápida do princípio ativo. São constituídos por uma parte líquida dentro de uma matriz polimérica formada por substâncias gelificantes e deixam pouco resíduo no local de aplicação. Existem vários tipos de géis de uso em produtos farmacêuticos e em produtos cosméticos, os mais comuns são os géis aniônicos e não-aniônicos.

O gel aniônico é aquele que apresenta características iônicas com carga negativa, pois os polímeros utilizados na formulação apresentam na sua estrutura química íons negativos. O gel não-aniônico não possui cargas iônicas na sua estrutura (ALLEN *et al.*, 2007).

De acordo com Vehabovic *et al.*, (2003), a estabilidade de um produto é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando fabricado.

O teste de estabilidade tem como finalidade avaliar o comportamento dos fármacos ou medicamentos e dos cosméticos que se alteram com o tempo, por influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como: a temperatura, a umidade e a luz. Além disso, tem também a finalidade de estabelecer um período de contraprova para um fármaco ou estabelecer a vida útil para os medicamentos e condições de armazenamento recomendadas (BRASIL, 2002). ANSEL *et al.* (2007), relatam que para garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica e formulações farmacêuticas e cosmeceúticas dentro dos limites especificados, são necessários os estudos de estabilidade.

Existem cinco importantes tipos de estabilidade a serem determinadas no desenvolvimento de um produto, como demonstrado na TABELA 1.

TABELA 1. TIPOS DE ESTABILIDADE ESTUDADA

Tipos de estabilidade	Condições do produto
Química	A integridade química.
Física	As propriedades físicas originais como aparência, homogeneidade entre outras.
Microbiológica	A esterilidade ou a resistência ao crescimento microbiológico e a eficácia dos agentes antimicrobianos.
Terapêutica	O efeito terapêutico deve permanecer inalterado.
Toxicológica	Não deve ocorrer aumento da toxicidade.

FONTE: ANSEL *et al.*, 1999; ALLEN *et al.*, 2007.

O presente estudo teve como objetivo avaliar duas formulações de gel contendo o ExPP em relação ao estudo de estabilidade e se foi mantida a atividade inibidora da enzima hialuronidase.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DO ExPP L

O composto bioativo de polissacarídeo e proteína (ExPP) foi obtido a partir da fermentação dos kefir tibetano em soro de leite doce desnatado da seguinte forma: o soro de leite doce desnatado foi enriquecido com 30% de glicose (p/v), 2% de peptona bacteriológica (p/v), 4% de fosfato de potássio monobásico e 4% de citrato de sódio diidratado, e pasteurizou-se o meio de fermentação a 63°C por 30 minutos. Após a pasteurização o meio foi inoculado com 6% da cultura de kefir tibetano (p/v) com uma contagem de  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  de BAL e  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  de leveduras, o tempo de fermentação foi de 48 h a 37°C.

Ao término da fermentação, o fermentado foi filtrado e centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi tratado com solução de TCA 10% e novamente centrifugado nas mesmas condições. O precipitado foi descartado e o sobrenadante tratado com etanol absoluto a 4°C na proporção de 1:3 e deixado em repouso à temperatura de 4°C por 24 h, após o tempo de precipitação o material foi centrifugado nas mesmas condições e novamente precipitado. Depois de precipitado e centrifugado o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em água destilada e dializado em membrana de dialise de 10-12 kDa por 72 h contra água destilada. O material dializado foi congelado e liofilizado (*freeze-dryer*, Modulyo<sup>R</sup>, Thermo Electron) e armazenado a temperatura ambiente.

### 2.2 FORMULAÇÃO

A partir da IC<sub>50</sub> do ExPP L de 2,5 mg/mL, foram desenvolvidas duas formulações: gel não-iônico com hidroxietilcelulose (natrosol Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) (gel 1ExPP L) demonstrado na TABELA 2 e gel aniônico de polímero de carboxivinílico (carbopol Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) (gel 2ExPP L) apresentado na TABELA 3.

TABELA 2. FÓRMULA GEL 1ExPP L.

Ingredientes	Concentração %
Natrosol	2 %
ExPP L	0,25 %
Mistura de parabenos + fenoxietanol	0,2 %
Água destilada	qsp. 100 mL

qsp. – quantidade suficiente para.

Em copo de Becker foi disperso o natrosol em 50% de água com a mistura de parabenos + fenoxietanol (conservante), com aquecimento de 50°C. Em outro copo de Becker foi disperso o ExPP L nos outros 50% de água e aquecido até 50°C. Em seguida misturou-se o ExPP L com o natrosol sob constante agitação até obter um produto homogêneo.

TABELA 3. FÓRMULA GEL 2ExPP L.

Ingredientes	Concentração %
Carbopol	0,5 %
ExPP L	0,25 %
Mistura de parabenos + fenoxietanol	0,2 %
Água destilada	qsp. 100 mL

qsp. – quantidade suficiente para.

Em copo de Becker foi disperso o carbopol em 50% de água e neutralizado com o AMP – 90 (aminopropanol 90) até atingir o pH de 6,0, depois de neutralizado foi adicionado a mistura de parabenos + fenoxietanol (conservante), com aquecimento de 50°C. Em outro copo de Becker foi disperso o ExPP L nos outros 50% de água e aquecido até 50°C. Em seguida misturou-se o ExPP L com o carbopol sob constante agitação até obter um produto homogêneo.

### 2.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

A avaliação da estabilidade foi realizada nas duas formulações de acordo com a metodologia preconizada na ANVISA (BRASIL, 2004), primeiramente as amostras

foram separadas em recipientes adequados e bem fechados evitando perda de gases ou vapor para o meio, cada recipiente continha 10 g da amostra e para cada teste tinha n=3, e cada recipiente apresentava um espaço vazio (*head space*) de aproximadamente um terço da capacidade do frasco para possíveis trocas gasosas.

Antes de iniciar os estudos de estabilidade, as duas formulações foram submetidas ao teste de centrifugação, neste teste cada formulação foi centrifugada a 3.000 rpm durante 30 minutos e avaliado quanto ao seu aspecto de homogeneidade.

Após o teste de centrifugação as amostras foram submetidas ao teste de estabilidade preliminar ou estabilidade acelerada com duração de quinze dias, da seguinte maneira:

Temperatura elevada em estufa (MARCA) de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Temperatura baixa em freezer (MARCA) de  $-10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Temperatura ambiente de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

As análises realizadas foram avaliação das características sensoriais como cor, textura e toque; avaliação do pH; análise microbiológica no tempo zero e no tempo de quinze dias, teste desafio (*challenge test*) e avaliação da atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase no tempo zero e quinze dias.

## 2.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Para análise microbiológica foi realizado a primeira diluição, pesando uma alíquota de 10 g do gel 1ExPP L e 10g do gel 2ExPP L, em seguida esta alíquota foi transferida para frascos com 90 mL de caldo Lethen (Difco), e homogeneizado.

### 2.4.1 Contagem de bactérias mesófilas e fungos

Para a enumeração de bactérias mesófilas e de bolores e leveduras foi empregado a técnica de *Pour Plate*. Para bactérias foi utilizada a primeira diluição de cada gel e em seguida realizado diluições em série até  $10^{-5}$  em solução salina esterilizada, foi transferido 1,0 mL de cada diluição para placa de petri e colocado ágar PCA (*Plate Count Agar* – Difco) e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Para bolores e leveduras foram utilizadas as mesmas diluições, porém foi colocado ágar

Sabouraud-Dextrose (Difco) e incubado a 25°C por até 7 dias. Após o tempo de incubação foi realizado a contagem de colônias e o resultado expresso em UFC/g do produto (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988; USP XXXIII, 2010).

#### 2.4.2 Pesquisa de patógenos

Para a análise de microrganismos patogênicos específicos, a partir da primeira diluição foi semeado com alça bacteriológica nos seguintes meios de cultivo: para *Staphylococcus aureus* em placa de petri com ágar manitol; para *Escherichia coli* placa de petri com ágar eosina-azul de metileno (EMB); para *Salmonella* sp. ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e para *Pseudomonas aeruginosa* ágar cetrimide, todas as placas de petri foram incubadas a 37°C por 48 h e avaliado o crescimento de colônias características para cada bactéria pesquisada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988; USP XXXIII, 2010).

#### 2.4.3 Teste desafio – *Challenge test*

O teste desafio foi realizado nas duas formulações de gel 1ExPP L e gel 2ExPP L. Neste estudo foram utilizadas cepas padrão das seguintes bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), também foram utilizadas a cepa de *Candida albicans* (ATCC 10231) e a cepa de *Aspergillus niger* (ATCC 16404).

A amostra foi dividida e cinco frascos com 20 g em cada e foram inoculados 0,1 mL de inóculo na concentração de 10<sup>6</sup> UFC/mL para cada microrganismo avaliado, em seguida incubaram-se os frascos a 35°C para as bactérias e a 25°C para a levedura e o fungo.

Procederam-se as contagens pela técnica de *Pour plate*, utilizando ágar Nutriente (Difco) para bactérias e ágar Batata-Dextrose (Difco) para fungo e levedura. As contagens foram efetuadas no tempo zero, 24 h, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias de incubação (USP XXXIII, 2010).

## 2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Para avaliar a atividade anti-inflamatória com a inibição da enzima hialuronidase foi utilizado o método *in vitro* de acordo com Reissing (1955), Aronson e Davidson (1967) e Kuppusamy *et al.* (1990).

Para a análise das amostras, foram adicionados 50 µL de cada amostra com diferentes concentrações previamente definidas e 0,5 ml da solução de ácido hialurônico (Sigma-Aldrich®) (1,2 mg de ácido hialurônico por mL de solução tampão acetato 0,1 M, pH 3,6, contendo NaCl 0,15 M) nos tubos de reação e controle. Os tubos foram incubados a 37°C por 5 minutos, em seguida foi adicionado 50 µL de enzima hialuronidase (350 unidades da enzima hialuronidase tipo IV - S a partir de testículos de bovino, Sigma-Aldrich®) dissolvida no mesmo tampão de substrato (concentração de 6,5 mg mL<sup>-1</sup>) e incubadas a 37°C por 40 min. A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de uma solução de hidróxido de sódio 4N, imediatamente colocou-se 0,1 mL de solução 0,8 M de tetraborato de potássio e incubou-se em banho fervente durante 3 minutos. Após o tempo de incubação adicionou-se 3 mL de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) (solução a 10% em ácido acético glacial contendo 12,5% de ácido clorídrico 10N) e novamente incubado a 37°C durante 20 minutos. Em seguida, as amostras foram medidas em espectrofotômetro (SP-2000 UV Spectrum) em 585 nm. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar estatisticamente os resultados foram submetidos ao teste de normalidade, a análise de variância (ANOVA) e seguidos de pós-teste utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ESTUDO DA ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade preliminar ou acelerada consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto, é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam a acelerar alterações passíveis de ocorrer. Para tanto são empregados condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre os componentes e mudanças nas características específicas do produto (ICH, 2003; BRASIL, 2004).

O presente trabalho seguiu o procedimento de estudo de estabilidade de acordo com a ANVISA (BRASIL, 2004), para formulações farmacêuticas e também foi avaliada a atividade anti-inflamatória de cada formulação durante o estudo.

No teste de centrifugação os dois géis não sofreram alteração quanto à homogeneidade, e as características sensoriais permaneceram inalteradas.

Foi acompanhado a variação de pH para cada formulação, sendo possível observar que não houve alteração no pH dos géis, os quais no primeiro dia tinham pH de 6,0 e após 15 dias de estudo da estabilidade reduziu para 5,9 e 5,8 para os géis 1ExPP L e 2ExPP L, respectivamente. A ANVISA (BRASIL, 2002) prevê como estável a formulação que apresenta uma variação de pH de  $\pm 2,0$  a partir do pH inicial, portanto os dois géis são estáveis quanto a este critério.

Quanto as características sensoriais (cor, textura, toque), foi possível observar que o gel aniônico (gel 2ExPP L) apresentou uma leve alteração na textura com a incorporação do princípio ativo, entretanto não são pegajosos ao toque. O gel não-iônico hidroxietilcelulose (gel 1ExPP L), por não possuir cargas não sofrem interferências do princípio ativo, quando este é incorporado, o que confere maior estabilidade a formulação, mas em relação ao sensorial como toque este tipo de gel é mais pegajoso.

### 3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A análise microbiológica é um parâmetro de suma importância na avaliação da qualidade de produtos não estéreis, pois estes produtos não são submetidos a nenhum processo de esterilização e somente é feita a adição de um sistema conservante para reduzir a velocidade de crescimento microbiano e conferir segurança ao produto. As análises realizadas seguem os padrões exigidos pelas farmacopeias, compêndios oficiais e Legislações, sempre se adotam valores de limites que não ofereçam risco de deterioração do produto e risco a saúde dos consumidores (PINTO *et al.*, 2000).

Os géis formulados foram avaliados quanto a contagem de mesófilas, contagem de bolores e leveduras, pesquisa de patógenos e o *Challenge test*. Nas análises de contagem e pesquisa de patógenos ao longo do teste de estabilidade foi observado de acordo com os resultados apresentados na TABELA 4, que não ocorreu contaminação durante a manipulação da formulação.

TABELA 4. RESULTADOS DA CONTAGEM DE MESÓFILAS, BOLORES E LEVEDURAS E PESQUISA DE PATÓGENOS.

Análises	Tempo zero	Tempo 7 dias	Tempo 15 dias
Contagem mesófila	Ausência	Ausência	Ausência
Contagem bolores leveduras	Ausência	Ausência	Ausência
Pesquisa de patógenos	Ausência	Ausência	Ausência

De acordo com a FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1988) e a USP XXXIII (2010), especificam os seguintes limites para produtos de uso tópico: contagem de mesófilas até  $10^3$  UFC/g ou mL, contagem de bolores e leveduras  $10^2$  UFC/g ou mL e para bactérias patogênicas é ausência, portanto, as formulações analisadas apresentaram seus resultados para a análise de contagem de mesófilas, bolores e leveduras estão dentro dos parâmetros exigidos, desta maneira conferindo segurança microbiológica ao produto. As formulações também não sofreram

alterações microbianas durante o estudo de estabilidade atendendo ao que é previsto pela ANVISA (BRASIL, 2002).

Em relação ao *Challenge test*, os dois géis apresentaram o mesmo comportamento para cada microrganismo testado, pois eles foram inoculados com carga microbiana de  $10^6$  UFC/g e após 24 h de incubação não foi observado diminuição na contagem, mas isto já era esperado uma vez que o tempo foi insuficiente para que agente conservante tivesse efeito sobre o desenvolvimento microbiano. Após 7 dias de incubação, as formulações foram amostradas e realizada as contagens, sendo avaliado o declínio da carga microbiana para  $< 1$  UFC/g.

A USP XXXIII (2010), explica que para produtos tópicos o *Challenge test* é considerado aceito quando ocorre redução de bactérias viáveis em, pelo menos, 99,9% da contagem inicial (tempo zero) a partir do sétimo dia, seguida de redução contínua até a finalização do teste. E redução dos bolores e leveduras em, pelo menos, 90% da contagem inicial, a partir do sétimo dia, seguida de redução contínua até a finalização do ensaio.

Seguindo a interpretação feita pela USP XXXIII (2010), o gel 1ExPP L apresentou eficácia na ação conservante em relação a todos os microrganismos testados e manteve a redução da carga microbiana, desta maneira confirmando a segurança da formulação. O gel 2ExPP L apresentou comportamento semelhante ao gel 1ExPP L, portanto também é uma fórmula segura em relação a eficácia do conservante.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE

A avaliação da atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase, foi realizada nos dois géis, no primeiro dia do estudo de estabilidade, no sétimo dia e no décimo quinto dia. Foi possível observar o comportamento em relação à atividade anti-inflamatória como demonstrado na FIGURA 2.

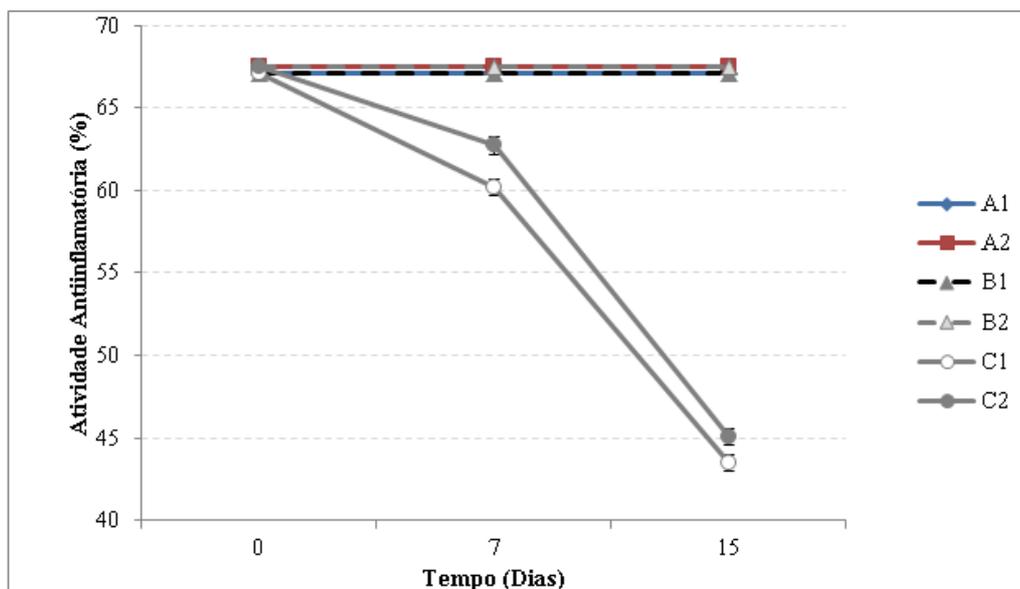


FIGURA 2. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA HIALURONIDASE PARA AS DUAS FORMULAÇÕES.

A1 – gel 1ExPP L a temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ , A2 – gel 2ExPP L a temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ ; B1 - gel 1ExPP L a temperatura ambiente, B2 - gel 2ExPP L a temperatura ambiente; C1 - gel 1ExPP L a temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , C2 - gel 2ExPP L a temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ .

As duas formulações mantiveram a atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase constante ao longo dos quinze dias de estudo da estabilidade quando submetidos a temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  e a temperatura ambiente, entretanto houve uma redução da atividade nas duas formulações quando submetidas a temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ . Isto indica que as duas formulações são estáveis à temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  e temperatura ambiente, a temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  as duas formulações apresentam uma redução na atividade anti-inflamatória e, portanto não é estável.

#### 4. CONCLUSÃO

O composto a base de polissacarídeo e proteína liofilizado foi incorporado em duas formulações de géis, em ambas as formulações não apresentaram alteração de pH ao longo do estudo de estabilidade, e em relação as características sensoriais o gel 2ExPP L apresentou melhor sensação ao toque. Nas análises microbiológicas não houve crescimento de microrganismos indicando que a manipulação e as matérias-primas utilizadas não estavam contaminadas, ainda na avaliação do *Challenge test* o sistema conservante utilizado foi eficiente ao longo do estudo de estabilidade, com redução da carga microbiana.

Na avaliação da atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima hialuronidase as duas formulações apresentaram redução da ação terapêutica quando submetidos à temperatura de 40°C, não sendo aconselhável que o produto seja exposto a essa condição.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ANSEL, H. C.; LOYD, V. A.; POPOVICH, N. G. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
- AROSSOS, N. N.; DAVIDSON, E. A. Lysosomal hyaluronidase from rat liver. **The journal of biological chemistry**. v. 242, p. 441-444, 1967.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº. 485, de 19 de março de 2002. Determina a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Brasília: Diário Oficial da Nação, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº. 398, de 12 de novembro de 2004. Determina a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Brasília: Diário Oficial da Nação, 2004.
- CUNHA, M. P.; GOMES, J. F. S. Order and Disorder in Product Innovation Models. **Creativity and Innovation Management**, v. 12, n. 3, p. 174-184, 2003.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. 400p.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION – ICH; Q1AR2, **Guidance for Industry** – Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2003.
- KUPPUSAMY, U.; KHOO, H.; DAS, N. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. **Biochem. Pharmacol.** v. 40, n. 3, p. 397-401, 1990.
- PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000, 309p.
- REISSING, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **J. Biol. Chem.** v. 217, n. 2, p. 959-966, 1955.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. 33. ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2010.
- VEHABOVIC, M.; HADZOVIC, S.; STAMBOLIC, F.; HADZIC, A.; VRANJES, E.; HARACIC, E. Stability of ranitidine in injectable solutions. **Int. J. Pharm.** v. 256, p. 109–115, 2003.