

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Introdução

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

## Materiais e métodos

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

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

O rendimento das extrações (R) foram calculados pela diferença do peso inicial (P<sub>i</sub>) e final (P<sub>f</sub>) de cada processo, a partir da equação 1.

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

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

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

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

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

**Desenvolvimento dos filmes** – Os filmes foram obtidos pelo sistema de “casting” que é a secagem de uma solução do polímero. Foram produzidos filmes a partir de dois métodos diferentes. No primeiro método,

o polímero úmido foi dissolvido em água deionizada, sendo aquecida em micro-ondas obtendo-se uma suspensão. A seguir foi adicionado glicerol como agente plastificante. A solução foi vertida em uma placa de Petri e levada à estufa de secagem com por 16 horas a 40°C, para evaporação do solvente, formando o filme 1. No segundo método o polímero em pó foi dissolvido em NH<sub>4</sub>OH, em banho-maria com temperatura entre 85° C  $\pm$  5°. A seguir foi adicionado glicerol. A solução foi vertida em uma placa de Petri e a secagem foi em capela a temperatura ambiente por 24 horas.

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

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

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

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

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

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

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

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

## Resultados

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

eficaz pela diminuição da cor marrom típica do açúcar mascavo.

**Extração da kefirana** – Após observar o baixo rendimento no método de extração 1 criou-se a necessidade de uma adaptação do método, originando assim o método de extração 2. O método de extração 2 apresentou rendimento de 9,95% (99,5 g/Kg de grãos de kefir), em contraste o rendimento obtido pelo método de extração 1, foi de 1,15% (11,5 g/Kg de grãos de kefir), sendo esta diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

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

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

Tabela 1: Valores de carboidratos totais da kefirana.

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

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

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

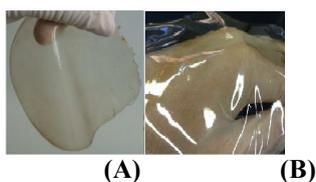
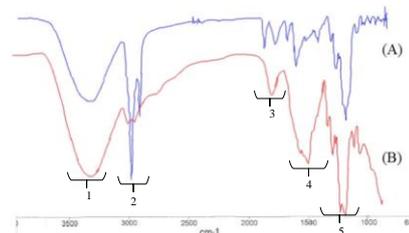


Figura 1: Filmes de kefirana (A) filme 1 (B) filme 2.

**FTIR** – Os espectros na região do infravermelho dos filmes 1 e 2, apresentaram picos que confirmaram os dados previstos para polímeros à base de kefirana. Observou-se os máximos em 3250 e 3272  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros dos filmes 1 e 2 respectivamente, que são atribuídas à deformação axial de grupamento hidroxila (O-H) dos polímeros. As bandas localizadas em 2923 e 2852  $\text{cm}^{-1}$  no filme 1 e 2928 no filme 2 referem-se à deformação axial simétrica e assimétrica de C-H em grupos funcionais metileno ( $\text{CH}_2$ ). Os máximos apresentados em 1740 e 1646  $\text{cm}^{-1}$  nos filmes 1 e 2 respectivamente, são atribuídas à deformação angular de O-H das moléculas de água presentes nos polímeros. As

bandas localizadas em 1490 e 1330  $\text{cm}^{-1}$  nos filmes 1 e 2 referem-se a deformação angular de C-H de grupos metílenos ( $\text{CH}_2$ ). Observou-se também dois máximos de absorção a 1015  $\text{cm}^{-1}$  para o filme 1 e 1041  $\text{cm}^{-1}$  para o filme 2 atribuídas à deformação angular de C-O-C dos anéis dos carboidratos presentes na estrutura dos polímeros, e aos grupamentos laterais C-OH e C-H.



1: região referente a 3450 – 3260  $\text{cm}^{-1}$ ; 2: região referente a 3000 – 2800  $\text{cm}^{-1}$ ; 3: região referente a 1740 – 1600  $\text{cm}^{-1}$ ; 4: região referente a 1500 – 1250  $\text{cm}^{-1}$ ; 5: região referente a 1250 – 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 3: Gráfico referente ao espectro de FTIR dos filmes (A) filme 1 (B) filme 2.

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

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

FILME	ESPESSURA ( $\mu\text{m}$ )	TRANSPARÊNCIA	TEOR DE UMIDADE (%)
1	96 ± 8 <sup>a</sup>	3,62 <sup>a</sup>	16,91 ± 0,520 <sup>b</sup>
2	37 ± 4 <sup>b</sup>	2,32 <sup>a</sup>	24,62 ± 0,223 <sup>a</sup>

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

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

## Discussão

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

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

Em relação à análise de FTIR, os filmes apresentaram uma banda intensa e alargada na região de 3000  $\text{cm}^{-1}$  e outra banda forte em torno de 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Segundo Wang; Bi [18] polissacarídeos contêm um número significativo de grupos hidroxila, exibindo uma banda alargada na região de  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, a presença de hidratos de carbono está associada aos máximos na região entre  $1250$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$ , tratando-se da região de impressão digital (região abaixo de  $1500\text{ cm}^{-1}$ ), confirmando que as substâncias estudadas tratam-se, inequivocamente, de polissacarídeos.

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

## Conclusão

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

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

## Agradecimentos

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

## Referências

- [1] BLANES, L. Tratamento de feridas. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: Baptista-Silva JCC editor, 2004.
- [2] RODRIGUES, B. F. F. S. Engenharia de tecidos para

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