



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**

**MARCELO MAGALHÃES DIAS**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO  
BIOLÓGICA *IN VITRO* DE BIOPOLÍMEROS DE AMIDO E DERIVADOS  
FENÓLICOS DO LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU**

**FORTALEZA**

**2017**

MARCELO MAGALHÃES DIAS

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA  
*IN VITRO* DE BIOPOLÍMEROS DE AMIDO E DERIVADOS FENÓLICOS DO  
LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientador: Profa. Dra. Selma Elaine Mazzetto.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

D533d Dias, Marcelo Magalhães.

Desenvolvimento, caracterização e aplicação biológica in vitro de biopolímeros de amido e derivados fenólicos do líquido da casca da castanha de caju / Marcelo Magalhães Dias. – 2017.  
137 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Selma Elaine Mazzetto.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Teste de biocompatibilidade. 3. Anacardium. 4. Biopolímeros. I. Título.  
CDD 660.6

---

MARCELO MAGALHÃES DIAS

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA  
*IN VITRO* DE BIOPOLÍMEROS DE AMIDO E DERIVADOS FENÓLICOS DO  
LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2017

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Selma Elaine Mazzetto (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Bruno Carvalho Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. George Táccio de Miranda Candeiro  
(Examinador - Externo)

---

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra  
(Examinadora)

---

Profa. Dra. Ramille Araújo Lima  
(Examinador - Externo)

À minha família, mais do que as palavras  
poderiam expressar ...

## AGRADECIMENTOS

À Deus, cuja bondade e cuidado extremados me permitiram chegar até aqui.

A meus pais, Eliomar e Clotilde, que além da vida, deram-me a dedicação, carinho e educação necessários.

À esposa e filhos, Lilian, Gabriel e Lucas, que souberam entender minha ausência. Nenhuma riqueza poderia valer mais que vocês.

À minha querida professora, orientadora e preciosa amiga, Selma Mazzetto. Seus ensinamentos foram muito além do conteúdo científico. Nunca esquecerei os conselhos e a doçura, até nas repreensões.

Aos membros das bancas avaliadoras, pela paciência e tempo dedicados à leitura desta obra. Juntos construímos um trabalho melhor.

Aos professores do LPT, Diego Lomonaco, Claudenilson Clemente, Jonas Maia e João Paulo, pela paciência em esclarecer nos momentos difíceis e facilitar-me seus conhecimentos.

Aos colegas ICs, Mestrandos e Doutorandos do LPT, em especial Eufrázio Júnior, Milena Alencar e Samuel Sampaio, que se tornaram amigos.

Aos colegas professores do curso de Odontologia, pelas muitas vezes que fizeram-me ampliar as ideias, mesmo em momentos casuais. Obrigado pela amizade e companheirismo.

Ao amigo e professor José Roberto Viana, pela cessão do laboratório de pesquisa, pela ajuda inestimável à concepção deste trabalho e pela atenção dispensada. Nunca esquecerei.

Ao amigo e incentivador primeiro deste trabalho, Denilson de Queiroz Cerdeira, pelo incentivo e pela amizade sincera e valiosa. Essa vitória é conjunta.

Aos professores da RENORBIO.

Enfim, a tantos que indiretamente ou invisivelmente fazem parte deste trabalho. Nós conseguimos.

## RESUMO

Os materiais biocompatíveis são descritos como materiais capazes de produzir respostas biológicas favoráveis no corpo. Atualmente, os requisitos de maior interesse da indústria química e biológica são o fácil processamento, portanto menor custo, e a obtenção de biomateriais a partir de fontes renováveis. Neste sentido, este estudo visa descrever a viabilidade de obtenção de novos materiais biocompatíveis, obtidos a partir de elementos da flora abundante na região Nordeste do Brasil, e portanto renováveis; a caracterização dos mesmos e avaliação de compatibilidade *in vitro*. Foram utilizados o amido vegetal obtido da mandioca (*Manihot esculenta*) e derivados fenólicos obtidos do líquido da casca da castanha de caju – LCC (*Anacardium occidentale*) como componentes principais na preparação de material termoplástico ativo, com propriedades biocompatíveis. Realizou-se a incorporação de ácido anacárdico ou cardanol, nas concentrações de 0.2, 0.5 ou 1.0% (m/m) em relação ao amido, e um material com amido apenas, totalizando sete grupos. Os materiais, chamados biomembranas, foram confeccionados por processamento térmico e analisados de forma a caracterizá-los quimicamente, e testar sua compatibilidade biológica *in vitro*. Foram caracterizados por testes de Análise Termogravimétrica (TGA), Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), cujos resultados se equivalem aos encontrados sobre amido termoplástico puro na literatura. As biomembranas foram testadas *in vitro* com células fibroblásticas bovinas pelo método *Live/Dead Fluorescence Assay* e se mostraram promissoras, uma vez que permitiram altas taxas de crescimento celular sobre sua superfície, com pouca mortalidade celular, o que pode indicar baixo ou nenhum potencial tóxico. Nenhum efeito antimicrobiano foi observado para nenhum dos grupos, no método testado. O processamento das biomembranas é de fácil obtenção e baixo custo, mostrando-se potencialmente favorável à produção em cadeia e em larga escala.

**Palavras-chave:** Materiais biocompatíveis. Teste de biocompatibilidade. *Anacardium*. Biopolímeros.

## ABSTRACT

Biomaterials are described as capable of producing positive biological answers to the body in which is applied. Currently, the most requested interests by chemical and biological industries are the easy process, low costs and renewable sources. In this way, this study describes the viability of obtaining new materials biocompatible, obtained from elements of abundant flora in Northwest of Brazil, and therefore renewable elements; also describes the characterization of the materials and evaluation of its compatibility *in vitro*. It was used vegetable starch, get from cassava (*Manihot esculenta*) and phenolic lipids derived from cashew nut shell liquid (*Anacardium occidentale*) as the major compounds in active thermoplastic material preparation, with biocompatible properties. It's been made incorporation of anacardic acid or cardanol, in concentrations of 0.2, 0.5 or 1.0% (m/m) in relation to starch, and one material made by starch only, totalizing seven groups. The materials, called biomembranes, were manufactured by termic process, and they were analyzed in order to characterize them and test its biological capability. The biomembranes were characterized by Termogravimetric Analysis (TGA), Fourier Transformed Infra-Red Spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) which results are equivalent to those found on pure thermoplastic starch in the literature. Biomembranes were tested *in vitro* with bovine fibroblast cells by the Live / Dead Fluorescence Assay method, which showed to be promising, since they allowed high rates of cell growth on its surface, with little cellular mortality, which may indicate low or no toxic potential. None antimicrobial effect was observed for nether one of the materials on the tested method. The processing of the biomembranes is easy to obtain and at low cost, being potentially favorable to chain production and in large scale.

**Key words:** Biocompatible Materials. Biocompatibility testing. Anacardium. Biopolymers.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fórmula estrutural química da amilose.....	21
Figura 2 –	Fórmula estrutural química da amilopectina e sua cadeia ramificada.....	22
Figura 3 –	Desenho esquemático da castanha de caju, fruto do cajueiro ( <i>Anacardium occidentale</i> L.).....	27
Figura 4 –	Fórmula química estrutural do ácido anacárdico, com suas variantes ligações insaturadas, o que confere os nomes Monoeno, Dieno ou Trieno.....	33
Figura 5 –	Fórmula estrutural química do ácido anacárdico e sua equação da reação de descarboxilação em Cardanol.....	34
Figura 6 –	Fórmula estrutura química da Calceína-AM.....	53
Figura 7 –	Fórmula estrutural química do Homodímero de Etídio-1.....	53
Figura 8 –	Fluxograma do isolamento do Ácido Anacárdico a partir do LCC.....	56
Figura 9 –	Fluxograma das etapas de isolamento do cardanol a partir do LCC.....	56
Figura 10 –	Etapas de produção dos filmes de amido termoplástico.....	58
Figura 11 –	Biomembrana de amido termoplástico manipulável removido da forma.....	59
Figura 12 –	Biomembranas de amido termoplástico esterilizados por diferentes dosagens de raios Y.....	59
Figura 13 –	Biomembranas colocados em placas multipoços para análise de compatibilidade biológica.....	63
Figura 14 –	Células fibroblásticas prontas para serem utilizadas.....	63

Figura 15 – Poços preparados com células em meio de cultura sobre as biomembranas.....	63
Figura 16 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtido para o ácido anacárdico.....	89
Figura 17 – Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono para ácido anacárdico.....	89
Figura 18 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtido para o cardanol saturado.....	90
Figura 19 – Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono para o cardanol saturado.....	91
Figura 20 – Espectro de massa do cardanol monoinsaturado.....	92
Figura 21 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do cardanol insaturado.....	93
Figura 22 – Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono do cardanol insaturado.....	94
Figura 23 – Termogravimetria do material bioplástico de amido sem impregnação de compostos fenólicos.....	97
Figura 24 – Termogravimetria do material bioplástico de amido impregnado de ácido anacárdico a 0,2%.....	98
Figura 25 – Termogravimetria do material bioplástico de amido impregnado de ácido anacárdico a 0,5%.....	99
Figura 26 – Termogravimetria do material bioplástico de amido impregnado de ácido anacárdico a 1,0%.....	100
Figura 27 – Termogravimetria do material bioplástico de amido impregnado de cardanol a 0,2%.....	101
Figura 28 – Termogravimetria do material bioplástico de amido impregnado de cardanol a 0,5%.....	102
Figura 29 – Termogravimetria do material bioplástico de amido impregnado de cardanol a 1,0%.....	103
Figura 30 – FTIR do material bioplástico de amido sem impregnação de lipídios fenólicos.....	105
Figura 31 – FTIR do material bioplástico de amido impregnado de ácido anacárdico a 0,2%.....	106

Figura 32 – FTIR do material bioplástico de amido impregnado de ácido anacárdico a 0,5%.....	107
Figura 33 – FTIR do material bioplástico de amido impregnado de ácido anacárdico a 1,0%.....	107
Figura 34 – FTIR do material bioplástico de amido impregnado de cardanol a 0,2%.....	108
Figura 35 – FTIR do material bioplástico de amido impregnado de cardanol a 0,5%.....	108
Figura 36 – FTIR do material bioplástico de amido impregnado de cardanol a 1,0%.....	109
Figura 37 – Fotografias de culturas de células coradas por Calceína (verde) e Homodímero de Etídio (vermelho).....	118
Figura 38 – Cultura de fibroblastos sobre biomateriais impregnados com ácido anacárdico, nas concentrações de 0.2, 0.5 e 1.0%.....	119
Figura 39 – Cultura de células sobre biomateriais impregnados com cardanol, nas concentrações de 0.2, 0.5 e 1.0%.....	120
Figura 40 – Placas de Petri para teste de sensibilidade antimicrobiana para <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> .....	123
Figura 41 – Testes de sensibilidade com <i>S. aureus</i> .....	123
Figura 42 – Ausência de halos de inibição em torno dos materiais testados.....	123
Figura 43 – Teste de sensibilidade antifúngica com <i>C. albicans</i> .....	124
Figura 44 – Testes de sensibilidade com <i>Escherichia coli</i> .....	124

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva DSC de amido termoplástico sem impregnação de lipídios fenólicos.....	111
Gráfico 2 - Curva DSC de amido termoplástico impregnado de 0,2% de ácido anacárdico.....	111
Gráfico 3 - Curva DSC de amido termoplástico impregnado de 0,5% de ácido anacárdico.....	112
Gráfico 4 - Curva DSC de amido termoplástico impregnado de 1,0% de ácido anacárdico.....	112
Gráfico 5 - Curva DSC de amido termoplástico impregnado de 0,2% de cardanol.....	113
Gráfico 6 - Curva DSC de amido termoplástico impregnado de 0,5% de cardanol.....	113
Gráfico 7 - Curva DSC de amido termoplástico impregnado de 1,0% de cardanol.....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do LCC natural e LCC técnico.....	25
Tabela 2 – Balança comercial de castanha de caju do Ceará no acumulado do ano.....	28
Tabela 3 – Exportação cearense de caju, por produto no acumulado do ano.....	28
Tabela 4 – Importação cearense de caju, por produto no acumulado do ano.....	29
Tabela 5 – Exportação cearense de castanha de caju, por país de destino.....	29
Tabela 6 – Exportações e importações por estados federados.....	30
Tabela 7 – Balança comercial dos subprodutos da castanha de caju do estado do Ceará.....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

LCC	Líquido da Casca da Castanha de Caju
AA	Ácido Anacárdico
CDN	Cardanol
CIN	Centro Integrado de Negócios
FIEC	Federação das Indústrias do Estado do Ceará
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
ROG	Regeneração Óssea Guiada
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido
PLA	Ácido Polilático
PGA	Ácido Poliglicólico
CA-AM	Calceína-AM
EthD-1	Homodímero de Etídio
KGy	Quilo Gray
TGA	Termogravimetria
FTIR	Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
RMN	Ressonância Magnética

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Amido.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Produtos naturais derivados do líquido da casca da castanha de caju (LCC).....</b>	<b>25</b>
2.2.1 <i>Ácido anacárdico.....</i>	31
2.2.2 <i>Cardanol.....</i>	34
<b>2.3 Glicerol.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4 Regeneração tecidual guiada.....</b>	<b>39</b>
<b>2.5 Membranas cirúrgicas para regeneração guiada.....</b>	<b>41</b>
2.5.1 <i>Membranas não-reabsorvíveis.....</i>	43
2.5.2 <i>Membranas reabsorvíveis.....</i>	47
<b>2.6 Marcadores celulares fluoregênicos.....</b>	<b>51</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
3.1 <b>Objetivo geral.....</b>	54
3.2 <b>Objetivos específicos.....</b>	54
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
4.1 <b>Obtenção do ácido anacárdico e cardanol.....</b>	55
4.2 <b>Obtenção das biomembranas.....</b>	57
4.2.1 <i>Caracterização dos filmes obtidos.....</i>	59
4.3 <b>Teste biológico <i>in vitro</i>.....</b>	61

<b>4.4</b>	<b>Avaliação de potencial antimicrobiano.....</b>	<b>64</b>
<b>5.</b>	<b>PATENTE 1.....</b>	<b>67</b>
<b>5.1</b>	<b>Campo da invenção.....</b>	<b>67</b>
<b>5.2</b>	<b>Objetos da invenção.....</b>	<b>72</b>
<b>5.3</b>	<b>Descrição detalhada da invenção.....</b>	<b>73</b>
<b>5.4</b>	<b>Reivindicações.....</b>	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>PATENTE 2.....</b>	<b>77</b>
<b>6.1</b>	<b>Campo da invenção.....</b>	<b>77</b>
<b>6.2</b>	<b>Objetos da invenção.....</b>	<b>84</b>
<b>6.3</b>	<b>Descrição detalhada da invenção.....</b>	<b>85</b>
<b>6.4</b>	<b>Reivindicações.....</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>7.1</b>	<b>Caracterização dos componentes do LCC.....</b>	<b>88</b>
<b>7.2</b>	<b>Caracterização dos biopolímeros de amido termoplástico.....</b>	<b>95</b>
<i>7.2.1</i>	<i>Análise termogravimétrica.....</i>	<i>95</i>
<i>7.2.2</i>	<i>Espectrometria infravermelha transformada de Fourier.....</i>	<i>104</i>
<i>7.2.3</i>	<i>Análises DSC.....</i>	<i>111</i>
<b>7.3</b>	<b>Testes in vitro de compatibilidade biológica.....</b>	<b>117</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>128</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>129</b>