

## Estudo Cristalográfico de Biofilmes de Kefir

E. C. M. Gonçalves<sup>a</sup>, N. S. Ferreira<sup>a</sup>, R. S. Matos<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>*Departamento de Física, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Brasil.*

### Introdução

O kefir é um líquido viscoso, com quantidades consideráveis de carbono na bebida láctea e pequenas porções de álcool [8]. Ele é uma bebida de ação probiótica que teve origem na região das montanhas do Cáucaso [16]. Os grãos de Kefir são compostos por microrganismo imobilizados com uma matriz de polissacarídeo e proteína [10]. Eles têm uma complexa composição microbiana, onde há predominância de bactéria do ácido láctico, bactérias acéticas, leveduras e fungos [15]. Em 1982 [19] relatou a atividade antitumoral de um polissacarídeo solúvel em água (KGF-C) isolado de grãos de kefir. O kefir possui algumas propriedades terapêuticas, tais como: nutricional [6, 7, 17, 18], antitumoral [4, 11], antibacteriana e antifúngica [2, 20].

Pesquisas recentes estudaram a superfície [13] e a estrutura [5, 13] de biofilmes a base de kefir, os quais demonstraram, respectivamente, que os biofilmes podem ter aplicações distintas, tais como: farmacológicas, já que apresentam uma distribuição uniforme de bactérias nativas do kefir (que são os microrganismos que combatem outros através da competição) na sua superfície e na indústria de alimentos com a obtenção de filme impermeável para a embalagem.

Nesta pesquisa, buscou-se estudar a cristalinidade de biofilmes de kefir produzidos com açúcar branco, que é refinado e ao contrário do açúcar mascavo, que possui muitos nutrientes, ele tem maior carga de sacarose e ainda retira minerais do organismo humano para poder ser digerido [1].

### Material e Métodos

Os biofilmes foram produzidos com solução de água destilada, grãos de kefir e açúcar branco comercial. Foram realizados três experimentos, iguais, onde se inoculou 40g/L de Kefir nas seguintes concentrações de açúcar mascavo: 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L e 80 g/L, respectivamente pesados em balança digital de precisão, em frascos com capacidade de 3000 mL.

Ainda foi produzido um filme com o açúcar e água destilada como base para comparações em termos da topografia superficial e cristalografia dos biofilmes. Esta metodologia de cultivo de biofilmes é a mesma proposta por [14].

Os biofilmes foram recortados ainda na placa de vidro em dimensões que variaram de 2 a 4 cm<sup>2</sup> e depositadas em um porta amostra com base de vidro e revestimento lateral de alumínio, para posteriormente serem levadas a câmara de um difratômetro da marca Rigaku, modelo Miniflex II, com modo de operação de radiação Cu K $\alpha$  ( $\lambda$ = 1.542Å, 40 kV e 1,2 mA).

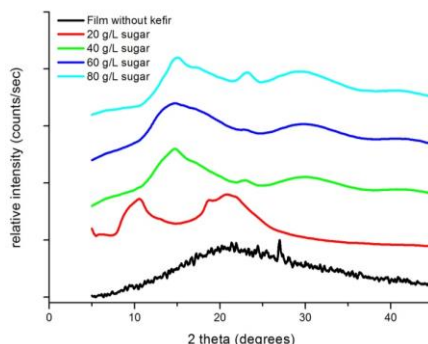
### Resultados e Discussões

As análises da difração de raios-X foram realizadas para determinar a influência do açúcar branco, na estrutura cristalina dos biofilmes. Os padrões de XRD dos biofilmes com concentrações de 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L e 80 g/L, mantendo a concentração de Kefir em 40g/L mostraram-se pouco semelhantes à do filme sem kefir.

O difratograma do filme sem kefir apresentou amorficidade de 99,9% o que confirma o caráter amorfo açúcar, característica bem explicada e discutida por [12]. A Fig. 2 mostra a comparação entre os difratogramas obtidos nesta análise. O filme sem kefir possui apenas um pico de difração de baixa intensidade em torno de 19-22° (2 $\theta$ ), que são semelhantes aos resultados encontrados por [5, 13] que mediram os XRD para filmes contendo kefirano (isolado a partir de grãos de kefir) e para biofilmes de kefir com açúcar mascavo, respectivamente.

Todos os difratogramas apresentam uma estrutura amorfo-cristalina, uma característica idêntica à de um polímero. As intensidades dos picos de difração se alteraram,

significativamente, quando comparadas com o filme sem kefir, para todos os biofilmes, quando a concentração de açúcar foi variando. Por outro lado, também, a cristalinidade dos biofilmes foi diminuindo à medida que a concentração de açúcar foi crescendo, conforme se pode ver na tabela 1. Este fenômeno mostra que à medida que se aumenta a concentração de açúcar, cuja característica principal é a amorficidade, as ligações cristalinas vão sendo quebradas.



*Figura 1. Gráfico comparativo dos biofilmes cultivados com kefir e açúcar Branco e o cultivado apenas com açúcar mascavo.*

Em análise é possível ver que entre 20 g/L e 60 g/L o percentual de cristalinidade foi diminuindo quase que linearmente e entre 60 g/L e 80 g/L houve um decréscimo drástico, representando uma saturação na composição cristalográfica, o que em princípio não deve ser encarado como anormal, já que isso pode estar associado a própria formação do biofilme, que não é um processo controlável, já que a formação de membranas in vivo não é um evento previsível [7].

*Tabela 1. Diferença percentual cristalográfica dos biofilmes de kefir cultivados em açúcar branco.*

| <b>Film Without Kefir</b> |                           |                         |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>Conc.</b>              | <b>Cristalinidade (%)</b> | <b>Amorficidade (%)</b> |
| 40 g/L                    | 0.1                       | 99.9                    |
| <b>Kefir Biofilm</b>      |                           |                         |
| 20 g/L                    | 42.5                      | 57.5                    |
| 40 g/L                    | 34.5                      | 65.5                    |
| 60 g/L                    | 29.6                      | 70.4                    |
| 80 g/L                    | 0.5                       | 99.5                    |

Estes resultados mostram que os biofilmes de Kefir cultivados em açúcar branco, são materiais parcialmente cristalinos, principalmente a concentrações entre 20 g/L e 60 g/L. Materiais semicristalinos como o polietileno, por exemplo, têm boa flexibilidade [3], o que representa uma forte evidência de que os biofilmes também apresentam, principalmente o de 20 g/L, flexibilidade essa que pode estar associada a falha dúctil ocasionada pelo relativo equilíbrio de fases amorfas e cristalinas nessa concentração.

Essas análises sugerem que os biofilmes de kefir cultivados em açúcar branco são menos adesivos que biofilmes cultivados em açúcar mascavo já que apresentaram mais fases cristalinas, o que não foi visto no estudo de [5, 13]. Por outro lado, o surgimento de mais fases cristalinas tornam os biofilmes mais dúcteis e resistentes à água (já que não possuirão tantas pontes de hidrogênio), uma característica muito semelhante à de um polímero o que expande a potencialidade de aplicação desse material.

## Conclusão

Nesta pesquisa foi realizado um estudo da cristalografia de biofilmes de kefir cultivados em açúcar comercial branco. Os difratogramas mostraram que os biofilmes apresentam uma estrutura semicristalina para todas as amostras, com amostras com percentual de quase 50% de cristalinidade, o que representa uma relativa semelhança a polímeros.

### Referências Bibliográficas

- [1] BETTA, S. R., LAGO, C. E., FARIA, D. A. M., BORGES, M. T. M. R., BERNARDI, M. R. V. Avaliação físico-química e sensorial de açúcares orgânicos e convencionais. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.16, n.2, p.155-162, 2014.
- [2] CEVIKBAS, A.; YEMNI, E.; EZZEDENN, F.; YARDIMICI, W. T. Antitumoral, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytother*, vol. 8, 2, 78-82, 1994.
- [3] COUTINHO, F. M. B.; MELLO, IVANA L.; SANTA MARIA, L.C.. Polyethylene: main types, properties and applications. *Polímeros*, vol.13, n.1, 2003.
- [4] FURUKAWA, N.; MATSUOKA, A.; TAKAHASHI, T.; YAMANAKA, Y. Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival day in mice bearing Meth-A. *Anim. Sci. Tec.*, vol. 62, 6, 579-585, 1991.
- [5] GHASEMLOU, M.; KHODAIYAN, F.; OROMIEHIE, A. Rheological and structural characterization of film-forming solutions and biodegradable edible film made from Kefiran as affected by various plasticizer types. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 49, 4, 814– 821, 2011.
- [6] GÜZEL-SEYDIM Z., SEYDIM A., GREENE A., BODINE A. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *J. Food Composit. Anal*, 13, 35–43, 2000.
- [7] ISRAELACHVILI J. N., *Intermolecular and Surface Forces*. Book, 2<sup>nd</sup>, Academic Press, 1992.
- [8] KNEIFEL, W. AND MAYER, H.K. Vitamin profiles of kefirs made from milks of different species. *International Journal of Food Science Technology* 26: 423-428, 1991.
- [9] KOROLEVA, N.S. Technology of kefir and kumys. *Bulletin of the International Dairy Federation* 227: 96-100, 1988.
- [10] LEITE, A. M. O., MIGUEL, M. A., PEIXOTO, R. S., ROSADO, A. S., SILVA, J. T., & PASCHOALIN, V. M. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341-349, 2013.
- [11] LIU J. R., WANG S. Y., CHEN M. J., YUEH P. Y., LIN C. W.. The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. *J. Sci. Food Agric*. 86, 2527–2533, 2006b.
- [12] MATHLOUTHI, M. Amorphous Sugar. In: VLITOS, A. J.; PÉREZ, S.; VACCARI, G. *et al.*; MATHLLUTHI, M.; BUBNÍK, Z. *et al.* *Sucrose - Properties and Applications*. Paris: Springer, cap.4, p.75-100, 1995.
- [13] MATOS, R. S. Caracterização superficial de biofilmes de kefir associado ao extrato de açaí e de cupuaçu. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amapá, 2015.
- [14] OLIVEIRA, A. F. Estudo de biofilmes de kefir obtidos em diferentes substratos e suas interações com extratos de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) e de gérmen de soja (*Glycine Max* (L.) Merrill). AP. 180 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, 2017.
- [15] PRADO, M. R., BLANDÓN, L. M., VANDENBERGHE, L. P. S., RODRIGUES, C. C., SOCCOL, V. T. & SOCCOL, C. R. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products, 2015.
- [16] ROCHA, D. M. U. P., MARTINS, J. F. L., SANTOS, T. S. S., MOREIRA, A. V. B. Labneh with probiotic properties produced from kefir: development and sensory evaluation. *Food Sci. Technol*, Campinas, 34(4): 694-700, Oct.-Dec. 2014.
- [17] SALOFF-COSTE CJ. Kefir: Nutritional and health benefits of yoghurt and fermented milks. *Danone World Newsletter*. 11, 1-7, 1996.

- [18] SARKAR S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, 109, 280-29, 2007.
- [19] SHIOMI, M., SASAKI, K., MUROFUSHI, M. AND AIBARA, K. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 35: 75-80, 1982.
- [20] ZACCONI, C.; PARISI M. G.; SARRA P. G.; DALLAVALLE P.; BOTTAZZI, V. Competitive exclusion of *Salmonella kedougouin* kefir fed chicks. *Microbiol. Alim. Nutr.*, vol. 12, unknown, 387-390, 1995.

*Agradecimentos:* Universidade Federal do Amapá, através do departamento de pesquisa pelo fomento à bolsa da estudante Ellen Caroline.