



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE DOIS  
EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS FERMENTADOS DE LEITE  
E EXTRATO DE SOJA POR GRÃOS DE KEFIR**

**PRISCILLA DE SOUSA BOTELHO**

RECIFE-PE

2018

**PRISCILLA DE SOUSA BOTELHO**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE DOIS  
EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS FERMENTADOS DE LEITE  
E EXTRATO DE SOJA POR GRÃOS DE KEFIR**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste em Biotecnologia.

**Orientador: Luciano Avallone Bueno**

**Co-orientadora: Maria Inês Sucupira Maciel**

RECIFE-PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

B748c Botelho, Priscilla de Sousa.  
Caracterização estrutural de dois exopolissacarídeos obtidos dos fermentados de leite extrato de soja por grãos de Kefir / Priscilla de Sousa Botelho. - Recife, 2018.  
142 f.: il.

Orientador(a): Luciano Avallone Bueno.

Coorientador(a): Maria Inês Sucupira Maciel.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2018. Ponto focal em Pernambuco – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Inclui referências e anexo(s).

1. Polissacarídeos microbianos
2. Análise térmica
3. Caracterização estrutural I. Bueno, Luciano Avallone, orient.  
II. Maciel, Maria Inês Sucupira, coorient. III. Título

CDD 620.8

# TERMO DE APROVAÇÃO

## UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:  
**PRISCILLA DE SOUSA BOTELHO**

**Caracterização estrutural de dois exopolissacarídeos obtidos dos fermentados de leite e extrato de soja por grãos de kefir**

### BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 21 de novembro de 2018

Orientador:

---

Prof. Dr. *Luciano Avallone Bueno*  
Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas - UFABC

Co-orientadora:

---

Profa. Dra. *Maria Inês Sucupira Maciel*  
Departamento de Ciências Domésticas - UFRPE

Examinadores:

---

Profa. Dra. *Tatiana Souza Porto*  
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

---

Prof. Dr. *Cláudio Augusto Gomes da Câmara*  
Departamento de Ciências Moleculares - UFRPE

---

Prof. Dr. *Clécio Souza Ramos*  
Departamento de Ciências Moleculares - UFRPE

---

Prof. Dr. *Antônio Felix da Costa*  
Instituto Agrônômico de Pernambuco - IPA

*Aos meus familiares.*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais pelo amor, respeito, apoio em todas as minhas decisões e esforço para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao meu irmão, Filipe, por fazer parte da minha vida, sempre me animando nos dias cansativos, fazendo-me esquecer as preocupações em alguns momentos, além de ajudar bastante com os 'softwares' e equipamentos que nos dão dor de cabeça, sempre que possível.

Ao meu companheiro Felipe, pelo respeito, atenção, apoio e paciência durante todo o processo final deste trabalho.

Aos meus amigos de trabalho, que foram virando amigos de vida e que me estimularam a não desistir desta etapa, mesmo com toda carga que eu vinha carregando nestes últimos anos. A todos os que conheci recentemente e vêm me acompanhando, e que, de uma forma ou de outra, fazem parte dos meus dias de pesquisa, dentre estes os que compõem o IFPE e a Escola de Frevo. Quero agradecer a minha amiga Magali, por toda ajuda e apoio, além dos momentos de alegria que sempre compartilhamos.

A todos os meus alunos do IFPE que iluminam minha trajetória.

Ao meu orientador prof. Luciano Bueno e a minha co-orientadora, prof<sup>a</sup>. Maria Inês, pela oportunidade, ensinamentos, orientação, paciência, confiança e compreensão.

À Renorbio.

Gostaria de agradecer também ao CENAPESQ.

Em especial, quero agradecer aos meus amigos-irmãos que se tornaram mais que amigos de trabalho e festas, Dayse, Andreza, Taciana, Gabriel, Guto, Mozart, Lucas e Simone. Agradeço por estarem presentes em todos ou quase todos os momentos (sem vocês seria difícil caminhar).

Enfim, a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para que eu pudesse realizar mais uma etapa da minha vida.

*"Eu quero ser tudo que sou  
capaz de me tornar."*

(Katherine Mansfield)

## RESUMO

Estudos referentes à Exopolissacarídeos (EPSs), polissacarídeos produzidos por micro-organismos, vêm crescendo nas últimas décadas devido à semelhança com gomas utilizadas no setor industrial como as gomas xantana, dextrana, gelana, pululana, glucanas de leveduras e os alginatos bacterianos. Estes EPSs apresentam um grande avanço para a indústria alimentícia, uma vez que podem ser utilizados no processamento de alimentos como espessante e/ou estabilizante e por apresentarem extrema importância no uso alternativo à gomas tradicionais. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo determinar as propriedades físico-químicas pH, Atividade de Água (Aa), Teor de Proteínas (TP) e Açúcares redutores (TAR), o comportamento térmico e a composição estrutural dos EPSs obtidos dos fermentados de leite de vaca e extrato de soja pela da matriz de micro-organismos dos grãos de kefir, Kefir BioLogicus®. Para verificação da homogeneidade e determinação de massa molar dos EPSs brutos foram realizados ensaios com Cromatografia de Exclusão por Tamanho de Alta Eficiência. A caracterização estrutural e a composição monossacarídica foram verificadas por análise por RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e GC-EM. O EPS da soja (EPSsj) e o EPS do leite (EPSle) apresentaram Aa de 0,21 e 0,26 a 25°C, respectivamente. Os resultados de pH e TP das amostras foram semelhantes, pH = 6,20 e TP ~1,5% do total da amostra. O resultado para a análise de Açúcares redutores (TAR) foi 11,3% para EPSle e 12,21% para EPSsj. O EPSsj apresentou a maior fração com massa molar  $1,17 \times 10^4$  g/mol e o EPSle apresentou em sua maior fração massa molar  $2,22 \times 10^6$  g/mol. O EPSsj em sua maioria é composto de moléculas de glicose formado por unidades de  $\alpha$ -Glc<sub>p</sub> ligadas-(1,4). O EPSle é constituído de moléculas de glicose, rarnose e galactose na formação  $\alpha$ -glcp-(1→4)- $\alpha$ -ramp-(1→6)- $\beta$ -galp. Bandas polissacarídicas características foram observadas no espectro infravermelho. Os dados dos IVs apresentaram similaridade a vários outros resultados para outros polissacarídeos presentes na literatura. Em relação ao comportamento térmico dos EPSs, as curvas termogravimétricas dos EPSs obtidas foram similares àquelas relatadas na literatura para outros EPSs. As temperaturas de degradação foram relativamente altas com vários eventos endo e exotérmicos, mostrando que os EPSs deste estudo apresentam alta estabilidade térmica e, conseqüentemente, poderiam ser usado como um aditivo em alimentos termicamente processados.

**Palavras-Chave:** Polissacarídeos microbianos, Análise térmica, Caracterização estrutural.

## ABSTRACT

Studies on Exopolysaccharides (EPSs), polysaccharides produced by microorganisms, have been growing in recent decades due to the similarity with gums used in the industrial sector such as xanthan gums, dextran, gellan, pullulan, yeast glucans and bacterial alginates. These EPSs present a breakthrough for the food industry, since they can be used in food processing as a thickener and/or stabilizer and because they are extremely important in the alternative use of traditional gums. In this context, the objective of this work was to determine the physicochemical properties of pH, Water Activity (Aa), Protein Content (TP) and Reducing Sugars (TAR), thermal behavior and structural composition of the EPS obtained from the obtained fermented of cow's milk and soybean extract by Kefir BioLogicus® Kefir grains microorganism matrix. With the purpose of verifying the homogeneity and determination of the molar mass of the raw EPS, tests were carried out with Chromatografia of Exclusion by Size of High Efficiency. The structural characterization and the monosaccharide composition were verified by  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR analysis and GC-MS. EPS of soybean (EPSsj) and EPS of milk (EPSle) presented Aa of 0,21 and 0,26 at 25°C, respectively. The pH and TP results of the samples were similar, pH = 6,20 and TP~1,5% of the total sample. The result for the analysis of reducing sugars (TAR) was 11,3% for EPSle and 12,21% for EPSsj. The EPSsj presented the largest fraction with  $1,17 \times 10^4$  g/mol molar mass and EPSle presented in its largest molar mass fraction  $2,22 \times 10^6$  g/mol. The EPSsj is mostly composed of glucose molecules formed by linked  $\alpha$ -Glc $\beta$  units (1,4). EPSle is composed of glucose, rhamnose and galactose molecules in the  $\alpha$ -glc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -ramp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -gal $\beta$  formation. Characteristic polysaccharide bands were observed in the infrared spectrum. The data of the IVs presented similarity to several other results for other polysaccharides present in the literature. In relation to the thermal behavior of the EPSs, the thermogravimetric curves of the EPSs obtained were similar to those reported in the literature for other EPSs. The degradation temperatures were relatively high with various endo and exothermic events, showing that the EPSs of this study have high thermal stability and could therefore be used as an additive in thermally processed foods.

**Keywords:** Microbial polysaccharides, Thermal Analysis, Structural characterization.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Grãos de Kefir	19
FIGURA 2	Grãos de kefir cultivados em tipos de meios diferentes	21
FIGURA 3	a. Kefir BioLogicus® de Limão e Tangerina; b. Kefir Real®	23
FIGURA 4	EPS de soja desidratado	24
FIGURA 5	Estrutura molecular do kefirano	26
FIGURA 6	Figura 1. Capítulo 1. Reação geral entre açúcares e o reagente Antrona	44
FIGURA 7	Figura 2. Capítulo 1. Perfil químico obtido por CETAE-ELM-IR de EPSsj	47
FIGURA 8	Figura 3. Capítulo 1. Perfil químico obtido por CETAE-ELM-IR de EPSle	48
FIGURA 9	Figura 4. Capítulo 1. Cromatograma (CG-EM) do EPSsj. Glicose (A); Manose (B); Galactose (C); arabinose (D); Xilose (E)	50
FIGURA 10	Figura 5. Capítulo 1. Espectro de massas da glicose do cromatograma de EPSsj.	50
FIGURA 11	Figura 6. Capítulo 1. Espectro de massas da monose do cromatograma de EPSsj	50
FIGURA 12	Figura 7. Capítulo 1. Espectro de massas da galactose do cromatograma de EPSsj	50
FIGURA 13	Figura 8. Capítulo 1 Espectro de massas da arabinose do cromatograma de EPSsj	51
FIGURA 14	Figura 9. Capítulo 1. Espectro de massas da xilose do cromatograma de EPSsj	51
FIGURA 15	Figura 10. Capítulo 1. Propostas de fragmentação para a 1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetil-D-glucitol	51
FIGURA 16	Figura 11. Capítulo 1. CROMATOGRAMA (CG-EM) DO EPSle. Galactose (A); Glicose (B); Ramnose (C)	53
FIGURA 17	Figura 12. Capítulo 1. Espectro de massas da galactose do cromatograma de EPSle	53

FIGURA 18	Figura 13. Capítulo 1. Espectro de massas da glicose do cromatograma de EPSle	53
FIGURA 19	Figura 14. Capítulo 1. Espectro de massas da ramnose do cromatograma de EPSle	53
FIGURA 20	Figura 15a. Capítulo 1. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ $\{^1\text{H}\}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de EPSle	55
FIGURA 21	Figura 15b. Capítulo 1. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de EPSle	57
FIGURA 22	Figura 16a. Capítulo 1. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ $\{^1\text{H}\}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de EPSsj	58
FIGURA 23	Figura 16b. Capítulo 1. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de EPSsj	59
FIGURA 24	Figura 1. Capítulo 2. Espectro de Infravermelho do EPSle	73
FIGURA 25	Figura 2. Capítulo 2. Espectro de Infravermelho do EPSsj	75
FIGURA 26	Figura 3. Capítulo 2. Espectros Termogravimétrico de Perda de Massa do EPSle (A) e Termogravimétrico Diferencial de Perda de Massa (B)	76
FIGURA 27	Figura 4. Espectros Termogravimétrico de Perda de Massa do EPSsj (C) e Termogravimétrico Diferencial de Perda de Massa (D)	76

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Vibrações de estiramento de algumas piranoses	34
TABELA 2	Deslocamentos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ observados em glucanas	36
TABELA 3	Deslocamentos químicos de grupos substituintes da hidroxila em polissacarídeos	37
TABELA 4	Tabela 2. Capítulo 1. Análise dos acetatos de alditóis do EPSsj por CG-EM	49
TABELA 5	Tabela 3. Capítulo 1. Análise dos acetatos de alditóis do EPSle por CG-EM	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

Aa	Atividade de Água
ABTS	Determinação da atividade antioxidante pelo 2, 2 – azinobis - 3- etil – benzotiazolina – 6-ácido sulfônico
BDA	Batata Dextrose Agar
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATD	Análise Térmica Diferencial
ATG	Análise Termogravimétrica
BALs	Bactérias ácido-láticas
CE	Cromatografia por Exclusão
CET- ELS	Cromatografia de Exclusão por Tamanho com Detector Evaporativo de Espalhamento de Luz
CETAE-ELM-IR	Cromatógrafo de Exclusão por Tamanho de Alta Eficiência acomplado a um detector de Espalhamento de Lasers Multiângulos e um detector de Índice de Refração
CFG	Cromatografia com Filtração em Gel
CG	Cromatografia Gasosa
CG-FID	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-CE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Exclusão de Partículas
CLAPTA	Cromatografia Líquida de Alta Pressão em Troca Aniônica
CLG-EM	Cromatografia Gás-Líquido com Espectrometria de Massas
CET-ELM	Cromatografia de Exclusão por Tamanho Acoplada a Detector de Espalhamento de Luz Multiangulos
CPG	Cromatografia por Permeação em Gel
CPG-CLPR	Cromatografia por Permeação em Gel com Cromatografia Líquida de Proteína Rápida
CPG-EM	Cromatografia por Permeação em Gel com Espectrometria de Massas

CPG-FID	Cromatografia por Permeação em Gel com Detector de Ionização por Chama
CPGAP	Cromatografia por Permeação em Gel de Alta Performance
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DPPH	Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPS	Exopolissacarídeo
EPSle	Exopolissacarídeo obtido do fermentado de leite
EPSsj	Exopolissacarídeo obtido do fermentado de soja
FRAP	Ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP (do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power)
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
IV	Infravermelho
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TAR	Teor de Açúcares Redutores
Td	Temperatura de Degradação
T <sub>f</sub>	Temperatura Final
T <sub>fu</sub>	Temperatura de Fusão
TP	Teor de Proteínas
TR	Tempo de Retenção
T <sub>0</sub>	Temperatura Inicial

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Grãos de kefir, Kefir e Kefirano</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Exopolissacarídeos</b>	<b>28</b>
<b>2.3</b>	<b>Determinação de massas molares por Cromatografia de Exclusão (CE)</b>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Cromatografia Gasosa (CG)</b>	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>Análise Termogravimétrica (ATG)</b>	<b>32</b>
<b>2.6</b>	<b>Espectroscopia de Infravermelho (IV)</b>	<b>33</b>
<b>2.7</b>	<b>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Obtenção dos Exopolissacarídeos (EPSs) dos fermentados de extrato de soja e leite por grãos de kefir</b>	<b>42</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Propriedades físico-químicas dos EPSs</b>	<b>42</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Determinação de massas molares dos EPSs</b>	<b>44</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Análise da composição monossacarídica dos EPSs</b>	<b>44</b>
<b>3.2.4.1</b>	<b>Hidrólise e acetilação dos EPSs</b>	<b>44</b>
<b>3.2.4.2</b>	<b>Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) dos alditóis acetilados</b>	<b>45</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b>	<b>45</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>46</b>
<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Análises físico-químicas dos Exopolissacarídeos (EPSs)</b>	<b>46</b>

3.3.2	Determinação de massas molares (CETAE-ELM-IR) e caracterização monossacarídica dos EPSs	47
4	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>69</b>
4.1	INTRODUÇÃO	70
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	71
4.2.1	Obtenção dos Exopolissacarídeos (EPSs) dos fermentados de extrato de soja e leite por grãos de kefir	71
4.2.2	Propriedades físico-químicas dos EPSs	71
4.2.3	Análise Termogravimétrica (ATG)	71
4.2.4	Espectroscopia de Infravermelho (IV)	72
4.2.5	Análise estatística	72
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.3.1	Propriedades físico-químicas e características estruturais dos Exopolissacarídeos (EPSs)	72
4.3.2	Espectroscopia de Infravermelho (IV)	73
4.3.3	Análise Termogravimétrica (ATG)	76
4.4	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXO I - ALGUNS MICRO-ORGANISMOS PRESENTES EM VÁRIOS TIPOS DE GRÃOS DE KEFIR</b>	<b>105</b>
	<b>ANEXO II - MICRORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR BIOLOGICUS</b>	<b>107</b>
	<b>ANEXO III - ESTUDOS REALIZADOS COM O KEFIRANO, SUAS APLICAÇÕES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS</b>	<b>108</b>

<b>ANEXO IV – EPSs E SUAS UTILIZAÇÕES EM PRODUTOS COMERCIAIS DA INDÚSTRIA</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO V - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE EPSs IDENTIFICADAS POR CG A PARTIR DO ANO 2000</b>	<b>126</b>
<b>ANEXO VI - ESTUDOS REALIZADOS COM O EPSs CONTENDO GLICOSE, SUAS APLICAÇÕES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS</b>	<b>134</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos que podem ser amplamente produzidos por microrganismos são chamados exopolissacarídeos (EPSs) ou polissacarídeos extracelulares. Esses biopolímeros encontram-se associados à superfície celular na forma de cápsulas ou são secretados para o meio extracelular em forma de muco. No geral, as bactérias e microalgas produzem os EPSs em maiores quantidades, enquanto que as leveduras e fungos os produzem em menores quantidades. Alguns dos EPSs produzidos por microrganismos podem ser utilizados em escala industrial como na indústria de alimentos (DUBOC; MOLLET, 2001; PIERMARIA et al., 2008; JUNGBUNZLAUER, 2016), farmacêutica (KHAN; PARK; I, 2007; JUNGBUNZLAUER, 2016), oleífera, (ROLLER; DEA, 1992; GHALY et al., 2007), dentre outras.

Os EPSs são gomas hidrossolúveis que possuem cadeias longas e ramificadas, com unidades repetidas de monossacarídeos, principalmente glicose, manose, galactose, ácido glucurônico e, às vezes, ramnose em diferentes proporções ou derivados destes açúcares (WELMAN; MADDOX; 2003). Estas gomas possuem propriedades diversificadas semelhantes às da dextrana, do agar, da gelana, xantana, pululana, glucanas de leveduras e alginatos bacterianos, biocompatibilidade e natureza não tóxica, assim apresentam vasta aplicabilidade em diversos setores industriais, com reologias desejáveis à indústria de alimentos (DUBOC; MOLLET, 2001; PIERMARIA et al., 2008; JUNGBUNZLAUER, 2016) e farmacêutica (KHAN; PARK; KWON, 2007; JUNGBUNZLAUER, 2016).

A exploração de novas composições e propriedades promissoras de EPSs e de composições que contem EPSs e às suas microbiotas associadas, tomou a atenção dos pesquisadores atualmente. Estes vêm sendo estudados objetivando o uso alternativo a polissacarídeos tradicionais, como a celulose, o amido e o alginato (SINGHA, 2012) devido aos benefícios proporcionados à saúde pelos pré e probióticos. Assim, estes EPSs são utilizados em produtos comerciais de todo o mundo em indústrias no ramo de cosmético e alimentos (COLENCI, 2017; DENCRIL, 2018; UNILEVER, 2018; DANISCO® DUPONT™, 2018; CPKELCO, 2018).

A indústria de alimentos se destaca por ser um dos setores mais dinâmicos da economia brasileira. De acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria de Alimentação (ABIA), o investimento na indústria de alimentos, de R\$11,1 bilhões em 2012, deve continuar a seguir o faturamento do setor, que tem crescido mais que o

Produto Interno Bruto (PIB) nos últimos anos (ABIA, 2012). A previsão do investimento para a indústria de alimentos no período 2015 a 2018 totaliza R\$49 bilhões. O dinamismo do setor de alimentos se reflete profundamente na necessidade que os empresários/gestores/pesquisadores devem ter quanto à inovação, visando atender com rapidez, ou mesmo com antecipação, às novas demandas e tendências dos consumidores. Tais tendências da alimentação, relacionadas à propensão dos indivíduos em modificar hábitos estabelecidos, é um resultado dos movimentos econômicos, sociais, culturais e políticos que afetam a vida das pessoas. De acordo com o estudo da Brasil Food Trends 2020, (2010), realizado pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP) e pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), as principais tendências dos consumidores de alimentos podem ser agrupadas em cinco categorias: Sensorialidade e Prazer; Saudabilidade e Bem-estar; Conveniência e Praticidade; Confiabilidade e Qualidade e Sustentabilidade e Ética. Com relação às tendências de “saudabilidade e bem-estar”, estas se originam em fatores como o envelhecimento das populações, as descobertas científicas que vinculam determinadas dietas às doenças, bem como a renda e a vida nas grandes cidades, influenciando a busca de um estilo de vida mais saudável.

A Empresa BioLogicus®, localizada na Av. Afonso Olindense, Várzea, Recife-PE, que tem como principais focos o desenvolvimento de técnicas e produtos inovadores com biotecnologia natural probiótica promovendo e inspirando um estilo de vida com saúde e longevidade, desenvolve e comercializa produtos alimentícios, cosméticos e dermocosméticos contendo os EPSs que são produzidos por grãos de kefir. Estes EPSs não foram estudados em sua totalidade, mas acredita-se que eles apresentem grande potencial para as aplicações em cosméticos, alimentos e cosme fármacos. Tal Empresa forneceu os EPSs utilizados neste estudo o qual visa como objetivo geral realizar a caracterização estrutural dos EPSs obtidos dos fermentados de grãos de Kefir BioLogicus® em leite de vaca e extrato de soja para sugerir esses EPSs como uma alternativa a espessante e estabilizantes tradicionais no processamento de alimentos. Assim, para atingir esse objetivo, propõem-se (1) verificar as massas molares dos EPSs extraídos dos fermentados de leite e de soja produzidos por grãos de kefir por Cromatografia de CETAE-ELM-IR; (2) determinar as características físico-químicas dos EPSs; (3) caracterizar estruturalmente os dois EPSs, utilizando métodos químicos e técnicas analíticas de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , IV, e CG-

EM; (4) Utilizar a Análise Térmica (ATG e ATD) para analisar o comportamento térmico dos EPSs.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Grãos de kefir, Kefir e Kefirano

Os grãos de kefir são aglomerados de 1-3 cm de comprimento, cor branco-amarelada, textura fina, porém firme e de forma irregular, com aparência de couve-flor ou de fragmentos de corais (Figura 1) (LA RIVIÈRE; KOOIMAN; SCHMIDT, 1967; MAGALHÃES et al., 2011; WANG et al., 2012).

FIGURA 1 - GRÃOS DE KEFIR



Fonte: [blog.biologicus.com.br](http://blog.biologicus.com.br).

Os grãos de kefir são compostos de uma microflora com leveduras, acetobactérias e bactérias ácido-lácticas (BALs) (*Lactobacilos*, *lactococos*, *leuconostoc*, *estreptococos*). As bactérias e as leveduras que compõem os grãos de kefir mais conhecidas constam no ANEXO I.

Na matriz composta por esses micro-organismos encontra-se, também, proteínas e polissacarídeos (OTLES; CAGINDI, 2003; MAGALHÃES et al., 2011). A matriz do grão é complexa, formada por 83% de água, 9-10% de polissacarídeos,

4,5% de proteínas, resíduos celulares e outros componentes desconhecidos (ABRAHAM; DE ANTONI, 1999).

O meio de cultura onde os grãos de kefir são cultivados influencia diretamente na reprodução destes grãos. Estudos realizados utilizando culturas mistas ou puras dos microrganismos que já foram identificados na composição dos grãos não reproduziram os grãos de kefir. Além dos estudos realizados com os tipos de culturas, os meios de cultura foram modificados, mas sem êxito na reprodução dos grãos. Acredita-se que o não ou pouco conhecimento do mecanismo de formação dos grãos é a principal causa do insucesso na reprodução destes (WANG et al., 2012).

Quando os grãos de kefir são cultivados em meios diferentes, produzem um fermentado denominado “kefir”. Originalmente, o kefir é um fermentado derivado do leite com aparência viscosa, ligeiramente alcoólico e carbonatado. Esta bebida é produzida a partir da ação da microbiota presente no interior dos grãos de kefir como descrito anteriormente (FARNWORTH; MAINVILLE, 2003; SARKAR, 2008; BIOLOGICUS, 2017). A palavra “kefir” em turco significa “sentir-se bem”, sendo também chamada *Kefyr*, *Kephir*, *Kippi*, *Kiaphur*, *Kepi*, *Kefer* e *Knapon* (KOROLEVA, 1988).

Originário historicamente das montanhas do Cáucaso, parte oriental da Ásia Central, localizada entre o Mar Negro e o Mar Cáspio, o kefir era para as tribos muçulmanas um presente de Alá e, por isso, não permitiam que outros povos muçulmanos tivessem acesso aos grãos. Eles consideravam os grãos de kefir uma fonte de riqueza e não revelavam a forma de preparação do kefir. Provavelmente esta crença tenha impedido a difusão de conhecimento sobre este alimento e o seu método de preparação e, assim, anos se passaram para que o restante do mundo conhecesse o kefir (KOROLEVA, 1988; GORSKI, 1994). Os grãos de kefir chegaram a Moscou em 1908, após uma expedição russa ao Cáucaso, e daí por diante o produto passou a ser difundido para outros locais do mundo. Por muitos anos, apenas pessoas que possuíam os grãos de kefir consumiam a bebida. O kefir era obtido repetindo-se sucessivamente o processo de obtenção desta bebida (FERREIRA, 2010).

Segundo Ferreira (2010), tradicionalmente o kefir era produzido em sacos de pele (bolsas de couro) que ficavam pendurados perto da porta, assim todos os que entravam ou saíam do estabelecimento empurravam ou chutavam a bolsa para homogeneizar o líquido. A bebida obtida neste processo apresentava pH ácido, teor baixo de álcool e, também, dióxido de carbono.

A produção do kefir pode ser realizada de forma contínua em que o líquido fermentado produzido é retirado, os grãos são submetidos a lavagens com água destilada e mais leite fresco é adicionado, promovendo a continuidade de processo fermentativo (KOROLEVA, 1988). Além do leite de vaca, a produção de kefir pode ser feita com leite de cabra, ovelha, camela e búfala (ABRAHAM; DE ANTONI, 1999; IRIGOYEN et al., 2005; KANVAS, 2015), água com açúcar mascavo, suco de frutas (HSIEH, 2012; BIOLOGICUS, 2017) e extrato de soja (LIU; CHEN; LIN, 2005; DADKHAH et al., 2011; KESENKAŞ et al., 2011) (Figura 2). Estudos realizados por WESCHENFELDER et al., (2011) revelaram aumento de massa diário, entre 3 e 7%, dependendo do meio utilizado. Este aumento de massa pode estar diretamente ligado à temperatura de cultivo dos grãos, renovação do leite em intervalos regulares, lavagem dos grãos e presença de nutrientes essenciais em concentrações adequadas ao aumento da biomassa (CHEN et al., 2009).

FIGURA 2 - GRÃOS DE KEFIR CULTIVADOS EM TIPOS DE MEIOS DIFERENTES



Fonte: [blog.biologicus.com.br](http://blog.biologicus.com.br).

Considerado um produto probiótico de mais alto nível devido à variedade de microrganismos e à perfeita simbiose demonstrada entre seus componentes, bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras, o kefir promove efeitos benéficos à saúde humana com o consumo diário, fazendo parte da dieta de povos de vários lugares do mundo como o Norte e Leste da Europa, Sudoeste da Ásia, Japão e América do Norte (OTLES; CAGINDI, 2003; FARNWORTH; MAINVILLE, 2003; BIOLOGICUS, 2017).

Alguns aminoácidos são produzidos durante o processo de produção de kefir em leite de vaca, como: a valina, leucina, lisina e serina. Já os aminoácidos alanina e

o ácido aspártico têm as suas concentrações diminuídas quando se compara o kefir ao leite *in natura*, mas também encontram-se presentes. O pH no kefir é baixo devido à formação de ácido láctico por fermentação da lactose. Além desses compostos, a vitamina B12, piridoxina, ácido fólico e biotina foram quantificadas por Kneifel e Mayer (1991).

O Kefir BioLogicus® é o Kefir desenvolvido pela empresa BioLogicus® a partir do Kefir Real do Cáucaso. De acordo com o boletim científico da BioLogicus (2017), os principais diferenciais do Kefir BioLogicus são a grande variedade de colônias probióticas e sua estabilidade microbiológica, o que no Kefir comumente comercializado em outros países há o sacrifício muitas espécies em seus processos produtivos, com o intuito de atingir uma estabilidade comercial mínima. Mais de 60 espécies de microrganismos foram identificadas no Kefir BioLogicus®. A estabilidade alcançada é fruto da tecnologia desenvolvida durante anos pelos pesquisadores que fundaram a BioLogicus. O principal logro dessa tecnologia foi alcançar a estabilidade microbiológica sem ter que eliminar nenhuma espécie do produto original.

A exclusão de alguns microrganismos realizada no Kefir comercializado em outros países implica na imprevisibilidade dos resultados terapêuticos que podem ser proporcionados com o consumo regular do Kefir. Com o Kefir BioLogicus® ocorre justamente o contrário, uma vez que todas as colônias são conhecidas e estáveis nos produtos desenvolvidos a partir delas, o que garante a qualidade do produto final (ANEXO II). Por outro lado, além de sua estabilidade microbiológica, o Kefir BioLogicus® é absolutamente natural, isento de qualquer aditivo químico sintético, além de não utilizar OGM (microrganismos geneticamente modificados). A BioLogicus® é detentora da patente do Kefir desenvolvido em sucos de frutas (BIOLOGICUS, 2017).

Diferentes centros de pesquisa, incluindo a BioLogicus, tem realizado diversos estudos a cerca dos resultados terapêuticos com o uso de probióticos, em especial, com o kefir. O Kefir BioLogicus possui todos os microrganismos probióticos que estão incluídos nas pesquisas que afirmam que o uso contínuo da bebida proporciona melhoria em: (1) distúrbios gastrointestinais devido à grande quantidade de compostos antimicrobianos e ácidos orgânicos que são produzidos pelos lactobacilos (LEITE et al., 2013); (2) diminuição de riscos de ulcera (ORHAN et al., 2013); gastrite e duodenite devido ao *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*

(MEDEIROS; PEREIRA, 2013); (3) diarreia devido à presença de *Lactobacillus acidophilus* que impossibilitam o crescimento de *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella typhosa* e *Escherichia coli* e neutraliza as enterotoxinas de *Escherichia coli*, além de reduzir a produção de flatos do cólon em humanos (VRESE; PHILIPPE, 2007); (4) alergias alimentares já que as bactérias probióticas promovem alívio da inflamação intestinal, além de proporcionar um efeito específico sobre a degeneração da mucosa intestinal (LIU et al., 2006; SAVILAHTI; KUITUNEN; VAARALA, 2008); (5) Infecção com *Helicobacter pylori*. A prescrição é recomendada no início do tratamento de *H. pylori* para suprir a deficiência de *Lactobacillus* sp. no estômago, diminuindo a infecção, já que a deficiência de *Lactobacillus* sp. está relacionada com as doenças causadas por *H. pylori* (CREMONINI; Di CARO; WANG et al., 2004; TONG et al., 2007; SACHDEVA; NAGPAL, 2009); (6) câncer. Algumas bactérias produtoras de ácido láctico são utilizadas como agentes promissores para auxiliar no tratamento do câncer devido às suas propriedades anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas. O Kefir pode inibir o crescimento de células cancerosas e pode prevenir certos tipos de câncer como o de cólon, entre outros (ABDELALI; CASSAND; SOUSSOTTE, 1995; LeBLANC; MATAR; FARNWORTH; PERDIGON, 2007; TOPUZ; DERIN, CAN; KÜRKLÜ, 2008).

O Kefir BioLogicus® pode ser encontrado comercialmente nas seguintes formas: Kefir BioLogicus® Limão (500 mL), sendo recomendado o consumo mínimo diário de 200 mL/dia; Kefir BioLogicus® Tangerina (500 mL), sendo recomendado o consumo mínimo diário de 200 mL/dia; e o Kefir Real® Cápsulas com embalagem com 60 cápsulas de 600 mg, sendo recomendada a dosagem mínima diária de cápsulas antes do desjejum (Figura 3).

FIGURA 3 - a. KEFIR BIOLOGICUS® DE LIMÃO E TANGERINA; b. KEFIR REAL®



Fonte: <https://blog.biologicus.com.br/informativo-cientifico.pdf>.

O kefirano é um exopolissacarídeo (EPS) produzido no centro dos grãos de kefir que confere tanto proteção como adaptação em sua produção bacteriana. Os EPSs formam camada protetora para as células contra as diversas condições ambientais externas e também servem como reservas de carbono e energia durante desnutrição no meio. O EPS desempenha uma ampla variedade de funções biológicas, incluindo a prevenção da dessecação e proteção contra estresses ambientais, como proteção contra toxinas e antibióticos (WHITFIELD; VALVANO, 1993; ROBERTS, 1996; SINGHA, 2012).

Após levantamento bibliográfico realizados em dois bancos de dados SciFinder e Periódicos Capes com as palavras “EPS”, “Caracterização estrutural” e “Kefirano” foram obtidos 103 artigos que trataram sobre testes em meios de cultura diferentes, propriedades físico-químicas, propriedades reológicas, caracterização estrutural e atividades biológicas e outras aplicações. Destes apenas 27 realizaram algum tipo de caracterização estrutural, sendo unanime a afirmação da composição do kefirano ser de glicose e galactose em proporções equivalentes.

Este polissacarídeo foi primeiramente estudado por La Rivière, Kooiman e Schmidt (1967) e posteriormente sua estrutura foi caracterizada por KOOIMAN (1968). Na sua forma bruta e desidratada, o kefirano tem aparência semelhante a de um açúcar qualquer ou goma no estado sólido (Figura 4).

FIGURA 4 – EPS DE SOJA DESIDRATADO



Fonte: O AUTOR (2018).

Em 1967, La Rivière identificou a *Lactobacillus Brevis* (agora chamada como *Lactobacillus kefir*) como sendo a bactéria responsável pela produção do kefirano. Em 1987, Toba, Abe e Adachi isolaram outra bactéria produtora do EPS e a chamaram de *Lactobacillus kefiranofaciens*.

Posteriormente, cinco diferentes tipos de bactérias do gênero *Lactobacillus* produtoras do kefirano foram isoladas. Estas bactérias produziram kefirano a partir dos grãos de kefir comercial. A lista publicada com os diferentes tipos de bactérias produtoras de kefirano mostrava o quanto complexas eram as relações taxonômicas das bactérias isoladas de kefir. Desta forma fica claro que outras bactérias presentes nos grãos podem ser capazes de produzir EPS iguais ou derivados do kefirano, dependendo da região originária dos grãos (YOKOI et al., 1990; QIN et al., 2011; ISPIRLI; DERTLI, 2018). Portanto, não se sabe qual o principal microrganismo responsável pela produção do kefirano, assim como não se sabe quais EPSs podem ser gerado quando há modificação do processo fermentativo ou mesmo se existem isômeros do kefirano ou mais de um tipo de polissacarídeo gerado (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008; ELSAYED et al., 2017).

A partir do trabalho realizado por Toba e colaboradores em 1991, verificou-se a otimização da produção de kefirano. Toba e colaboradores (1991) produziram 80 mg de kefirano por litro de substrato (m/v), utilizando soro de leite acrescido de glicose e da enzima peptona tripticase. Eles observaram que a viscosidade da solução aumentou à medida que a massa do EPS aumentava.

Quantitativos maiores de kefirano foram obtidos por Yokoi e Watanabe (1992). Eles obtiveram uma produção de 273 a 406 mg de polissacarídeo/ L, utilizando soro de leite com cinco bactérias isoladas da microbiota dos grãos de kefir. Quantidades maiores que  $\approx 2\text{g/L}$  foram obtidas por otimização das culturas anteriores (YOKOI; WATANABE, 1992; MICHELI et al., 1999).

Estruturalmente, o kefirano é formado por uma cadeia principal com ramificações hexa ou heptassacarídica com unidades repetidas, quantitativamente equivalentes de dois açúcares residuais, glicose e galactose, aleatoriamente ligados com rotação ótica de  $+68^\circ$  (Figura 5). O primeiro a propor essa estrutura foi Kooiman em 1968.



composto de *D*-glicose e *D*-galactose (1.0:0.43) (LIU, CHEN; LIN, 2002), enquanto o EPS obtido do Kefir BioLogicus de Soja apresentou um EPS formado unicamente de moléculas de glicose (BOTELHO et al., 2014).

Botelho et al., (2014) identificou previamente que o EPS obtido por grãos de Kefir em fermentado de soja apresentava apenas moléculas de glicose em sua composição, mas não identificou o tipo deste EPS, se havia homogeneidade ou heterogeneidade da sua massa molar, assim como o tamanho deste biopolímero e os se mesmo era constituído por  $\alpha$ - ou  $\beta$ -ligações.

Os EPSs produzidos por Bactérias ácido lácticas (BALs), incluindo o kefirano, contribuem para propriedades reológicas específicas, como viscosidade, e de textura adequada para produtos lácteos fermentados (FRENGOVA et al., 2002). O kefirano apresenta maior solubilidade em água quente e menor em água fria formando uma solução viscosa na concentração de aproximadamente 2% m/v (LA RIVIÈRE; KOOIMAN; SCHMIDT, 1967).

Wang et al., (2008a) utilizaram o kefirano para melhoria das propriedades reológicas de géis, promovendo o aumento da estabilidade e viscosidade aparente desses géis durante o armazenamento. Em géis ácidos, o kefirano melhorou as propriedades de viscosidade e viscoelasticidade, sendo, portanto, uma forma alternativa aos emulsificantes e estabilizantes tradicionais para produtos lácteos (RIMADA; ABRARAM, 2006).

Além do uso como aditivo alimentar, há relatos que o kefirano pode ser utilizado como agente modulador do sistema imunológico em camundogos, possui atividades antimicrobiana *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *Rhizoctonia*, *Pseudomonas* sp. *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *C. albicans*, *S. pyogenes* e *S. aureus*, atividade citotóxica em células de fibroblastos de ratos, antitumoral e anti-inflamatória em ratos albinos, atividade antioxidante em ensaios com DPPH, ABTS e FRAP contribui para a redução do aumento da pressão arterial, redução de lesões hepáticas e cicatrização de feridas em camundongos, redução dos níveis de colesterol e do níveis de triglicerídeos (ANEXO III) (MAEDA et al., 2004; MAEDA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; VINDEROLA et al., 2006; PAIVA, 2013; JEONG et al., 2017; JENAB; ROGHANIAN; EMTIAZI; GHAEDI, 2017; BLANDÓN et al., 2018; RADHOUANI et al., 2018). Atividades semelhantes foram relatadas em outros EPSs (ANEXO VI).

## 2.2 Exopolissacarídeos

O EPSs possuem estruturas ramificadas ou não e longas com unidades repetidas de monossacarídeos, principalmente glicose, manose, galactose, ácido glucurônico e ramnose em diferentes proporções ou derivados destes açúcares (WELMAN; MADDOX; 2003). Essas biomoléculas hidrossolúveis são vastamente aplicadas no setor industrial por apresentarem propriedades emulsificantes, estabilizantes, gelificantes, ligantes, lubrificantes, coagulantes, espessantes, suspensores e formadoras de filme. A que se destina as aplicações dos EPSs depende da estrutura química desses biopolímeros (DUBOC; MOLLET, 2001; ROTTAVA et al., 2009; ESNAASHARI et al., 2014).

A indústria de alimentos tem utilizado amplamente biopolímeros para o aumento da textura, viscosidade e elasticidade dos alimentos (DUBOC; MOLLET, 2001; ROTTAVA et al., 2009). A indústria oleífera também se beneficia do uso de biopolímeros para melhorar as propriedades do fluxo de fluídos utilizados na perfuração durante o processo de extração do óleo, assim como na recuperação de óleos (GHALY et al., 2007).

Embora a produção de polissacarídeos por plantas e algas marinhas tenha sido utilizada há décadas, incluindo, dentre estes a celulose, o amido, o alginato e carragena de algas e sementes e pectina de plantas e agar (SINGHA, 2012), a exploração de novas composições e propriedades promissoras de EPSs tomou a atenção dos pesquisadores atualmente. Muitas indústrias no ramo de cosmético e alimentos têm utilizado os EPSs como aditivo em seus produtos como cosméticos, produtos de higiene bucal e pessoal, fibras para tratamento de ferimentos e cortes cirúrgicos, alimentos, entre outros. O uso dos EPSs de diferentes origens tem crescido gerando grande procura no mercado por todo o mundo. Dentre as empresas que comercializam produtos com adição de EPSs estão Johnson & Johnson, Dencril, DANISCO® DUPONT™, LM FARMA, SCJohnson, CP Kelco, FOREVER Health Food, PHARMACOSMOS, ANIKA THERAPEUTICS, MONTANA POLYSACCHARIDES, SOLVAY e Ametech (ANEXO IV).

Destacam-se dentre estes EPSs, a curdlana (produzida pela bactéria *Alcaligenes faecalis* var. *mixogenes*), a welana (produzida pela bactéria *Alcaligenes* sp), a xantana (produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas* spp.), a goma gelana (produzida pela bactéria *Pseudomonas elodea*) e o kefirano (produzido pelos grãos

de kefir) (SUTHERLAND, 1998; REHM, 2009; YANG, 2011; IMESON, 2011; NOSHLY, 2018).

Além das aplicações industriais, acredita-se que os EPSs conferem algumas funções em seu meio natural desempenhando um papel no reconhecimento celular e de proteção à célula microbiana contra dessecação, fagocitose, antibióticos ou compostos tóxicos, protozoários, estresse osmótico, adesão em superfícies sólidas e formação de biofilmes (DE VUYST; DEGEEST, 1999; GRIFFITTS et al., 2005).

### **2.3 Determinação de massas molares por Cromatografia de Exclusão (CE)**

Para a separação de componentes de alta massa molar utiliza-se a Cromatografia por Exclusão (CE) que se baseia na separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. Para este método existem duas divisões, a Cromatografia com Filtração em Gel (CFG) e Cromatografia com Permeação em Gel (CPG) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; VOGEL, 2002).

Por não haver interações físicas ou químicas entre o soluto e a fase estacionária, a CE difere dos outros métodos cromatográficos pelos tamanhos das moléculas. Para a retenção das moléculas do soluto ocorre a penetração diferenciada destas no interior das partículas do gel. O empacotamento da coluna é feito com material inerte com poros de tamanhos controlados. Quando as moléculas da solução entram em contato com a fase estacionária, as moléculas menores ficam retidas no interior de seus poros sendo eluídas mais lentamente pela fase móvel, ou seja, apresentando maior tempo de retenção, enquanto que as moléculas maiores, que não conseguiram ficar retidas nos poros, são excluídas do leito empacotado e eluem primeiro no volume morto, tendo, portanto, menor tempo de retenção. As moléculas médias poderão penetrar os poros em vários graus dependendo de seu tamanho (COLLINS; GUIMARÃES, 1997; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; VOGEL, 2002).

O material utilizado para empacotar a coluna deve apresentar estrutura rígida e capaz de suportar pressões elevadas usadas na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Geralmente o empacotamento da coluna para este método é feito por leito de polímeros e partículas de sílica, ambos com diâmetro de 5 a 10µm. Este método é utilizado na separação de materiais orgânicos e inorgânicos, mas o principal grupo estudado são compostos de alta massa molar como as biomoléculas ou polímeros com alto grau de polimerização (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; VOGEL, 2002).

Para monitorar o fluxo da fase móvel que sai da coluna utilizam-se detectores. Estes detectores medem de forma contínua as propriedades físico-químicas das amostras, ou da solução, enviando um sinal para que haja o registo dos tempos de retenção de cada fração separada pelas fases estacionária e móvel. Estes sinais geralmente são proporcionais à concentração da amostra presente no sistema (VOGEL, 2002; NETO; NUNES, 2003).

Os detectores podem ser divididos em (1) detectores de propriedades macroscópicas e (2) detectores de propriedades do soluto. Os detectores de propriedades macroscópicas medem as alterações de propriedades físicas provocadas pelo soluto na fase móvel, já os detectores de propriedades do soluto respondem a uma dada propriedade química ou física do soluto e são, idealmente, independentes da fase móvel (VOGEL, 2002; NETO; NUNES, 2003; HARRIS, 2005).

Os detectores mais utilizados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) são: ultravioleta, índice de refração, espalhamento de luz, eletroquímico, de fluorescência, de massas e infravermelho. Dentre estes métodos de detecção, o método por espalhamento de luz é o mais adequado para detecção de compostos de alta massa molar (HARRIS, 2005).

Neste método, a adição de detecção do espalhamento de luz avançada aumenta significativamente o desempenho da cromatografia de exclusão (CE). As massas molares precisas são identificadas por espalhamento de luz estática, enquanto que o espalhamento de luz dinâmica é usado para estudo do tamanho molecular. Os dois métodos funcionam de forma complementar um ao outro. O espalhamento de luz aumenta a sensibilidade para frações grandes permitindo a descoberta de agregação em quantidades muito pequenas (AGILENT, 2018).

## **2.4 Cromatografia Gasosa (CG)**

A Cromatografia Gasosa é uma técnica bastante utilizada para separação, identificação e quantificação de substâncias devido à facilidade de aplicação da técnica. Ela pode ser usada em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise ou de forma isolada (COLLINS, 1997).

Por ser um método físico-químico, a cromatografia é baseada na migração dos componentes de uma mistura de forma diferencial. Isso que ocorre devido à imiscibilidade de duas fases, sendo uma das fases chamada estacionária, fase fixa de

grande área superficial, e a outra chamada fase móvel, formada por um fluido que se move através da fase estacionária (LANÇAS, 1993; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Os métodos cromatográficos podem ser classificados: (1) quanto ao mecanismo de separação, (2) quanto à técnica empregada e (3) quanto ao tipo de fase utilizada. Mas, a classificação mais popular divide a cromatografia em cromatografia em coluna e cromatografia planar (LANÇAS, 1993).

Entre os diferentes métodos que têm sido utilizados para a identificação e quantificação de carboidratos, os métodos cromatográficos são mais precisos, dentre eles encontra-se a cromatografia gasosa.

Neste método, a fase estacionária pode ser sólida, com uma grande área superficial, ou líquida, onde uma película delgada líquida recobre um sólido inerte; e a fase móvel é um gás denominado gás de arraste, sendo este inerte que tem a finalidade de transportar as moléculas a serem separadas. Desta forma, a amostra é vaporizada e introduzida em uma corrente de gás que elui continuamente pela coluna, sendo, assim, a amostra arrastada através da coluna (LANÇAS, 1993; BONATO, 1997).

Para que as amostras possam passar na coluna na forma de vapor, as amostras devem ser voláteis e termicamente estáveis. Essas características das amostras são necessárias a fim de que elas não se decomponham nas condições da separação. Nestas condições, apenas gases e aproximadamente 20% dos compostos orgânicos são analisados por este método sem que haja modificação estrutural para aumentar sua volatilidade. O gás de arraste e a amostra devem ser considerados não reativos entre si, assim adota-se um gás inerte que apresenta somente a função de carregar a amostra volatilizada. As vantagens da CG destacam-se pelo custo do método e do tempo reduzido de análise (GUIMARÃES; COLLINS, 1997; CECCHI, 2003).

Para identificar a composição monossacarídica em análise de carboidratos, geralmente, após a sua purificação, realiza-se a hidrólise da amostra (NELSON; COX, 2002). A hidrólise pode ser realizada por meio de enzimas ou com a utilização de ácidos. Identificadas as melhores condições para a hidrólise, a etapa seguinte da análise é a identificação dos monômeros que constituem o carboidrato. Os métodos cromatográficos mais utilizados para este tipo de análise são a cromatografia líquida de alta pressão em troca aniônica (CLAPTA), juntamente a cromatografia gasosa (RUAS-MADIEDO; LOS REYES-GAVILAN, 2005).

O tipo de ligação glicosídica e a configuração anomérica dos carboidratos podem ser determinadas por meio da análise dos acetatos de alditóis metilados ou parcialmente metilados pelas técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), infravermelho (IV) (SILVERSTEIN, 1994; MOHAČEK-GROŠEV; BOŽAC; PUPPELS, 2001) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (GORIN, 1981; SILVA et al., 2005).

O ANEXO V apresenta estudos que usaram a CG para identificação de monossacarídeos em EPSs.

## **2.5 Análise Termogravimétrica (ATG)**

A análise térmica abrange um conjunto de técnicas que permitem o monitoramento de propriedades físicas ou químicas de uma amostra em função da temperatura ou do tempo através de uma programação de temperatura-relação estrutura/propriedade, além de avaliar a estabilidade térmica de vários compostos, dentre estes, polímeros e biopolímeros (ANTONUCCI; TOTH, 1983; RAMOS-SINCHEZ; RODRIGUEZ-TORRES, 1991; MOTHE; AZEVEDO, 2002).

A Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) são algumas das técnicas utilizadas em análise térmica. Estas técnicas nos possibilitam obter informações de variação de massa, estabilidade térmica, ponto de fusão, ponto de ebulição, água livre e água de hidratação, pureza, calores de transição, calores específicos, transições vítreas, etc.

A TG é muito utilizada para verificar a estabilidade de um material (perfil de degradação) em temperatura e atmosfera controladas em determinado tempo. As propriedades físicas e/ ou químicas de matérias, assim como a estrutura podem ser alteradas através da exposição às temperaturas elevadas. O termograma é um dos nomes atribuídos a curva da termoanálise (ALMEIDA et al., 2008).

O conjunto temperatura-tempo é o estímulo particularmente mais efetivo no sistema disperso de polissacarídeos, a partir do processo mais brando que garante a dissolução primária até o processo mais severo que inicia a decomposição química. Na escala mais baixa de resposta, a gelatinização e inchaço são as ocorrências primárias; na escala de resposta superior, a desidratação química, pirólise e reorganização das ligações gerando espécies superiores na fase volátil (FAGERSON,

1969) e compostos aromáticos e corantes (VERCELLOTTI; ANGELO; SPANLER, 1992), e uma série de outras pequenas moléculas terminais. Em conjunto com outras características físico-químicas a aplicabilidade de exopolímeros é largamente dependente de seu comportamento reológico e térmico (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005). Na análise térmica do EPS o calor é emitido e absorvido com o acompanhamento da mudança da estrutura do polímero e fusão do polímero cristalino (WANG et al., 2010).

## **2.6 Espectroscopia de Infravermelho (IV)**

A espectroscopia de IV estuda interações com a matéria a nível vibracional. Para que ocorra absorção da radiação infravermelha deve ocorrer variação do momento de dipolo elétrico da molécula à medida que ela vibra ou rotaciona. Desta forma, há interação entre a molécula e o campo elétrico da radiação. Pode-se, também, explicar um espectro de absorção do infravermelho quando há coincidência entre a transição de dois níveis vibracionais e a frequência da componente da radiação eletromagnética incidente (PAVIA et al., 2010).

A espectroscopia de IV é um método bastante sensível e rápido, podendo ser considerado de baixo custo. O espectro obtido é, provavelmente, a propriedade física mais singular do material analisado devido à área de impressão digital da molécula. Essa técnica qualitativa é amplamente utilizada para auxílio na elucidação estrutural de compostos utilizados na área da química. O método foi a princípio utilizado para investigação de compostos relativamente puros, no entanto, novas técnicas permitiram análises estruturais mais detalhadas de macromoléculas puras e seus oligômeros, análise de misturas de polímeros e amostras brutas, e até interações entre macromoléculas específicas (KACURAKOVA; WILSON, 2001). Desta forma, a espectroscopia de IV se tornou uma das ferramentas mais frequentemente utilizadas para o estudo de materiais poliméricos.

A região do infravermelho médio ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) é a faixa do infravermelho mais utilizada para diversos tipos de análise. Até a década de 80, os materiais comumente analisados limitavam-se a monômeros de celulose e amido. Em anos posteriores, assim como atualmente, a análise abrangiu uma variedade de carboidratos, incluindo açúcares comerciais, celulose, pectinas, amido, hemicelulose, carragenas, hialuronatos, entre outros (KACURAKOVA; WILSON, 2001). Com o

auxílio da ressonância magnética nuclear podem ser feitas identificações em diversas estruturas como as de Exopolissacarídeos (EPS), por exemplo. Para esse tipo de análise, os espectros do material analisado são comparados a espectros de padrões ou comparados com os de outros EPSs normalmente encontrados na literatura (KRCMAR et al., 1999; WANG et al., 2010). Algumas absorções características de piranoses estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Vibrações de estiramento de algumas piranoses.

Piranoses	Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )
$\alpha$ -D-Glicose	855 – 833
$\beta$ -D-Glicose	905 – 876
$\alpha$ -D-Galactose	839 – 810
$\beta$ -D- Galactose	914 – 866
$\alpha$ -D-Manose ou $\alpha$ -L-Manose	843 – 818
$\beta$ -D- Manose	898 – 888
$\alpha$ -D-Xilose	760 – 740
$\beta$ -D-Arabinose ou $\beta$ -L-Arabinose	855 – 830

Fonte: YANG; ZHANG, 2009.

## 2.7 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

RMN é uma técnica espectroscópica que estuda vários núcleos, sendo mais comumente disponíveis o hidrogênio (<sup>1</sup>H) e o carbono (<sup>13</sup>C). Além destes, o fósforo (<sup>31</sup>P), flúor (<sup>19</sup>F) e Nitrogênio (<sup>15</sup>N) também são utilizados. Esses átomos absorvem energia em frequências específicas quando colocados em campo eletromagnético forte. O deslocamento químico é expresso pela frequência de ressonância de um núcleo específico, sendo simbolizado pela letra grega delta ( $\delta$ ) e esse núcleo é sensível ao ambiente químico, dessa forma o espectro de RMN pode ser usado como “fingerprint” (impressão digital) da molécula (PAVIA et al., 2010; SILVA et al., 2006).

Se comparadas as técnicas de RMN e Infravermelho (IV), pode-se observar que a importância do RMN se sobrepõe à importância do IV para a análise estrutural, isso porque o IV revela apenas grupos funcionais presentes em uma molécula. Diferentemente do IV, o RMN proporciona informações referentes ao número de

átomos magneticamente diferentes do isótopo usado como referência na análise (PAVIA et al., 2010).

Análises estruturais de moléculas de açúcares têm sido feitas com o auxílio da espectroscopia de RMN. Foi através desta técnica que se obteve a maioria de dados relativos à configuração de estruturas de açúcares redutores. À medida que a técnica foi ficando mais sensível, em conjunto com compostos marcados por  $^{13}\text{C}$ , a região ocupada por carboidratos conformacionais foi ficando mais definida. Para melhor tradução do espectro de açúcares faz-se necessário estar consciente de todas as mudanças moleculares possíveis e assim será possível a interpretação de açúcares mais complexos (BUBB, 2006).

Os carboidratos podem ser classificados como aldeídos, cetonas ou polióis (ROBYT, 1998). Essas estruturas têm algumas características que são vantajosas para a sua elucidação estrutural, assim como a análise conformacional. A RMN é uma técnica muito utilizada na elucidação de carboidratos, com experimentos unidimensionais, como RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , sendo utilizado como um dos primeiros passos em estudos sobre caracterização estrutural de açúcares. Pode-se observar nos espectros que o número de resíduos de açúcares pode ser estimado pela integração dos sinais na região dos prótons anoméricos (DUBB, 2006).

Os solventes utilizados para a realização de RMN de polissacarídeos em estado líquido são água e dimetilsulfoxido, sendo água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) e  $\text{DMSO-}d_6$ , mas também é relatado o uso de clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), piridina- $d_5$ . As amostras que serão preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$ , geralmente, são liofilizadas algumas vezes para suprir ao máximo o sinal dos dois hidrogênios da água e desta forma não ocultar a intensidade dos outros hidrogênios do polissacarídeo (BUBB, 2006).

Os experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  podem também mostrar alguma indicação sobre a ligação e sequência dos resíduos de açúcar através dos valores de deslocamentos químicos, somado a isso os experimentos bidimensionais de RMN homo e heteronuclear podem contribuir para realizar a caracterização completa da estrutura de oligo e polissacarídeos. O RMN de  $^1\text{H}$  mostra sinais de hidrogênios anoméricos e se são bem resolvidos, eles aparecem como dupletos com constantes de acoplamento característicos de hidrogênios ligados a carbono  $J_{H1, H2}$  podem ser obtidas, anomérico, assim como informa a conformação espacial do grupo ligado ao carbono anomérico. Já o RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  é muito menos sensível que o RMN de  $^1\text{H}$  devido à baixa abundância natural do núcleo  $^{13}\text{C}$  e pela relação giromagnética que é

de apenas  $\frac{1}{4}$  da de  $^1\text{H}$ , mas os espectros de  $^{13}\text{C}$  mostram uma maior dispersão de desvios químicos.

Para o RMN de  $^{13}\text{C}$  pode-se observar deslocamentos químicos em uma faixa ampla que vai, em geral, de 60 a 110 (Tabela 2). Já os sinais de hidrogênios de polissacarídeos se sobrepõem na região entre 3.5 - 5.0 no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , desta forma torna-se difícil atribuir os sinais a esses prótons (YANG; ZANG, 2009).

Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  observados em glucanas.

Glucana	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$[\alpha\text{-Glc}(1\text{-}3)\text{-}]_n$	101.3	72.2	83.2	71.7	73.7	62.2
$[\alpha\text{-Glc}(1\text{-}4)\text{-}]_n$	99.8	71.9	73.0	78.7	71.4	60.5
$[\beta\text{-Glc}(1\text{-}2)\text{-}]_n$	102.7	83.1	77.0	69.3	76.1	61.4
$[\beta\text{-Glc}(1\text{-}3)\text{-}]_n$	104.7	74.9	88.0	69.9	77.8	62.5
$[\beta\text{-Glc}(1\text{-}4)\text{-}]_n$	103.4	74.3	76.1	79.9	75.4	61.5
$[\beta\text{-Glc}(1\text{-}6)\text{-}]_n$	104.2	74.2	75.7	69.6	76.1	70.0

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados a carbonos anoméricos são geralmente, no intervalo de  $\delta_{\text{H}}$  4,2-5,8. Os hidrogênios  $\alpha$ -anoméricos entre  $\delta_{\text{H}}$  4,8-5,8 e os hidrogênios  $\beta$ -anoméricos entre  $\delta_{\text{H}}$  4,2-4,8. Os valores de deslocamentos químicos para os carbonos anoméricos são encontrados na faixa  $\delta_{\text{C}}$  95-110, para os carbonos  $\alpha$ -anoméricos, os valores são entre  $\delta_{\text{C}}$  97-103, e os carbonos  $\beta$ -anoméricos entre  $\delta_{\text{C}}$  103-106 (BUBB, 2006).

O  $^3J_{\text{H}1, \text{H}2}$  para resíduos de açúcar na configuração galacto está em torno de 3-4 Hz para a forma  $\alpha$  e 7-8 Hz para a forma  $\beta$ . Para sugestões na configuração manno, o  $^3J_{\text{H}1, \text{H}2}$  é menor; cerca de 2 Hz para a forma  $\alpha$  e ainda menor para a forma  $\beta$ , com o resultado de que nem sempre são resolvidos (BUBB, 2003). Quando as constantes de acoplamento  $^3J_{\text{H}1, \text{H}2}$  são muito pequenas e/ou não resolvidas, a constante de acoplamento  $^1J_{\text{C}1, \text{H}1}$  pode ser usada, assim, o valor de 170 Hz indica a forma  $\alpha$ , enquanto 160 Hz é uma indicação para a forma  $\beta$  (LUNDQVIST, 2015).

Os outros hidrogênios dos açúcares são geralmente encontrados na região de  $\delta_{\text{H}}$  3,2-4,5. Há mudança neste deslocamento químico quando há grupos substituintes no hidrogênio da hidroxila em polissacarídeos, assim os deslocamentos químicos aparecem em campo baixo, cerca de 0.2–0.5 para prótons e para carbono 6-7, como

exemplos podem ser citados os grupos metil, etil, sulfato e fosfato (DUUS et al., 2000). Os grupos metila dos açúcares 6-desoxi e dos grupos *O*- e *N*-acetila encontram-se no intervalo de  $\delta_H$  1,2-2,3. Os outros carbonos glicosídicos são encontrados na faixa de  $\delta_C$  50-85, e os carbonos ligados a nitrogênios, o seus deslocamentos químicos aparecerão em torno de  $\delta_N$  50-60 e os carbonos não-substituídos na faixa de  $\delta_C$  65-75. Já os carbonos envolvidos na glicosilação têm valores na região de baixo campo entre  $\delta_C$  5-10. Carbonos em posição C-6 não substituído são encontrados em torno de  $\delta_C$  60-63 e os carbonos C-6 ligados a outro resíduo de açúcar aparecerão em torno de  $\delta_C$  65-70. Os sinais de carbono dos grupos metila encontram-se na região entre  $\delta_C$  15-30, e os carbonos de carbonila encontram-se entre  $\delta_C$  165-185. Alguns destes deslocamentos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Deslocamentos químicos de grupos substituintes da hidroxila em polissacarídeos.

Grupos Substituintes		Deslocamentos químicos			Referências
		$^1H$	$^{13}C$	$^{31}P$	
Metil	[ $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ )]	1.28	17.8	-	LIU et al., 2008.
	$\alpha$ -Rha	1.33	17.8	-	GANESHAPILLAI et al., 2009
Etil	[ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ )]	2.02	24.8 176.7	-	LIU et al., 2008.
Carboxil	[ $\alpha$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ )]	-	, 177.3	-	LIU et al., 2008.
Fosfato	[ $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ P $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ )]	-	-	0.78, 1.67	GANESHAPILLAI et al., 2009

A determinação das ligações glicosídicas nos polissacarídeos nativos por RMN unidimensional ( $H^1$  e  $C^{13}$ ) pode-se tornar difícil devido às quatro possibilidades de ligações a partir do carbono anomérico que os monômeros apresentam. Faz-se necessária a combinação de técnicas de RMN unidimensional e bidimensional (HSQC e HMBC - (Correlação a longa distância  $H^1 - C^{13}$ ), assim como degradação enzimática e química ou acetilação dos sacarídeos produzindo alditóis acetatos que são analisados por Cromatografia gasosa.

A caracterização estrutural (composição e conformação da cadeia do EPSs) assim como a determinação de suas propriedades físico-químicas são de extrema

importância para a aplicação destes biopolímeros na indústria. As propriedades reológicas dos produtos em que são utilizados os EPSs como aditivos estão intimamente ligadas com o tipo de estrutura destes biopolímeros. Além das aplicações para melhoramento da reologia de diversos produtos, os EPSs podem apresentar atividades biológicas, e esta propriedade também está relacionada à composição e comportamento do EPS (YANG; ZANG, 2009).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo verificar algumas propriedades físico-químicas e reológicas dos EPSs extraídos dos fermentados dos grãos de kefir, Kefir BioLogicus®, e caracterizar estruturalmente estes EPSs para possíveis aplicações nas indústrias de alimentos e de cosméticos.

### 3. CAPÍTULO 1

## **Caracterização de dois exopolissacarídeos obtidos dos fermentados de grãos de kefir em extrato de soja e leite – parte I**

Priscilla de Sousa BOTELHO<sup>a</sup>; Magali da Silva AMORIM<sup>b</sup>, Gabriel Olivo LOCATELLI<sup>a</sup>, Maria de Fátima F. MARQUES<sup>c</sup>, Djalma N. MARQUES<sup>c</sup>, Maria Inês Sucupira MACIEL<sup>a</sup>; Luciano Avallone BUENO<sup>d</sup>

### RESUMO

Polímeros extracelulares (EPSs) têm sido utilizados no processamento de alimentos como espessantes e/ou estabilizantes e têm sido extensivamente estudados nas últimas décadas devido à sua semelhança com as gomas usadas na indústria alimentícia. Este estudo caracterizou parcialmente dois exopolissacarídeos obtidos a partir de grãos fermentados de kefir em extrato de soja (EPS<sub>sj</sub>) e leite (EPS<sub>le</sub>). Foram verificadas as propriedades físico-químicas, massas molares e composição dos EPSs liofilizados. Análises realizadas pelo CETAE-ELM-IR mostraram que os dois EPSs apresentam grande heterogeneidade em suas massas molares. A composição monossacarídica foi verificada por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e CG-EM. EPS<sub>sj</sub> apresentou maior porcentagem de moléculas de glicose e menor porcentagem de moléculas de manose e galactose formadas por unidades ligadas a  $\alpha$ -Glc $p$ -(1,4). EPS<sub>le</sub> consiste em quantidades equivalentes de moléculas de galactose e glicose na formação  $\alpha$ -glc $p$ -(1→4)- $\alpha$ -ramp-(1→6)- $\beta$ -gal $p$ .

Palavras-chave: Kefir; Polissacarídeos microbianos; Biopolímeros

<sup>a</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil; priorganica@gmail.com

<sup>b</sup>Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

<sup>c</sup>BioLogicus-Ind. e Com. de Produtos Naturais S.A., Recife, Brasil.

<sup>d</sup>Universidade Federal do ABC, São Paulo, Brasil.

## 1 INTRODUÇÃO

Polímeros de carboidratos, também chamados de polissacarídeos, podem ser produzidos por diversos organismos vivos, dentre estes, os micro-organismos como bactérias, leveduras, microalgas e fungos. Estes polímeros são também chamados de polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos (EPSs) que se encontram associados à superfície celular na forma de cápsulas ou são secretados para o meio extracelular em forma de muco. Bactérias e microalgas detêm a maior produção de EPSs, seguida dos fungos e leveduras que produzem estes carboidratos em menor quantidade. Estudos mostram que alguns micro-organismos produzem quantidade de EPS satisfatória para o uso em escala industrial como alternativa aos polímeros usados tradicionalmente (SUTHERLAND, 1990; SILVA et al., 2006; JUNGBUNZLAUER, 2012).

Os EPSs são gomas solúveis em água que possuem cadeias longas e ramificadas, com unidades repetidas de monossacarídeos, destacando-se manose, glicose, ácido glucurônico, galactose e em algumas estruturas a presença de ramnose. Estas unidades encontram-se em diferentes proporções ou como derivados destes açúcares (WELMAN; MADDOX; 2003). Na indústria, os EPSs apresentam vasta aplicabilidade devido às propriedades semelhantes às do agar, dextrana, xantana, gelana, pululana, glucanas de leveduras e alginatos bacterianos e reologias desejáveis à indústria de alimentos (DUBOC; MOLLET, 2001; PIERMARIA et al., 2008; JUNGBUNZLAUER, 2012; ZHOU et al., 2018), farmacêutica (KHAN; PARK; KWON, 2007; JUNGBUNZLAUER, 2012), oleífera, (ROLLER; DEA, 1992; GHALY et al., 2007), dentre outras.

As propriedades dos EPSs proporcionam o seu uso como emulsificantes, estabilizantes, agentes gelificantes, ligantes, lubrificantes, coagulantes, espessantes, suspensores e formadores de filme. A aplicação do biopolímero e sua estrutura química apresentam relação direta. Dentre eles destacam-se curdlana (produzida pela bactéria *Alcaligenes faecalis* var. *mixogenes*), xantana (produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas* spp.), goma gelana (produzida pela bactéria *Pseudomonas elodea*), welana (produzida pela bactéria *Alcaligenes* sp), levana, entre outras (SUTHERLAND, 1998; REHM, 2009; YANG, 2011; IMESON, 2011; NOSHLI, 2018).

Nos últimos anos tem-se notado um crescente investimento no estudo das propriedades de biopolímeros para uso alternativo na indústria de alimentos,

cosméticos e dermocosméticos principalmente para o aumento da textura, viscosidade, elasticidade e encapsulamento de alimentos e produtos farmacêuticos (DUBOC; MOLLET, 2001; ROTTAVA et al., 2009; ZHOU et al., 2018). Além da indústria de alimentos e farmacêutica, a indústria oleífera também se beneficia do uso de EPS para melhorar as propriedades do fluxo de fluídos utilizados na perfuração durante o processo de extração do óleo, assim como na recuperação de óleos (GHALY et al., 2007).

Alguns EPSs estão associados à superfície celular na forma de cápsulas ou são secretados para o meio extracelular na forma de muco. Durante a fermentação de determinado meio por grãos de kefir são produzidos vários EPSs, dentre eles o kefirano que é formado de monômeros de glicose e galactose em proporções equivalentes (LA RIVIÈRE et al., 1967; KOOIMAN, 1968).

O kefir é um produto fermentado de aparência viscosa, levemente alcoólica e carbonatada, obtido originalmente do cultivo de grãos de kefir em leite. Tradicionalmente a bebida é produzida adicionando os grãos ao leite, produzindo, dessa forma, uma fermentação ácido-láctica que resulta em diversos compostos bioativos, incluindo o ácido láctico, o ácido acético e vários compostos aromáticos que lhe conferem um sabor refrescante. (FARNWORTH; MAINVILLE, 2003; SARKAR, 2008). A palavra Kefir origina-se do turco “Keyif”, que significa, em tradução livre, “sentir-se bem” (KOROLEVA, 1988; FERREIRA, 2010).

O kefir faz parte da dieta de povos de vários lugares do mundo, como o norte e o leste da Europa, o sudoeste da Ásia, o Japão e a América do Norte (OTLES; CAGINDI, 2003; FERREIRA, 2010).

O kefir é considerado um produto probiótico devido aos seus efeitos benéficos à saúde humana com o seu consumo diário (FARNWORTH; MAINVILLE, 2003; OTLES; CAGINDI, 2003). Após a fermentação, 25% da lactose presente no meio inicial é transformada em ácido láctico. São formados os aminoácidos valina, leucina, lisina e serina, enquanto a alanina e o ácido aspártico têm suas concentrações diminuídas quando comparados ao leite *in natura*. Além desses compostos, vitamina B12, piridoxina, ácido fólico e biotina aparecem em quantidades que dependem da fonte de grãos de kefir usados (KNEIFEL; MAYER, 1991).

O presente estudo teve por objetivo determinar as propriedades físico-químicas dos EPSs obtidos das bebidas fermentadas denominadas Kefir BioLogicus®

de leite e de soja e caracterizar as suas composições estruturais por RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e CG-EM.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos Exopolissacarídeos (EPSs) dos fermentados de extrato de soja e leite por grãos de kefir

Os EPSs foram obtidos a partir das bebidas fermentadas denominadas Kefir BioLogicus® de leite e de extrato de soja. Os EPSs brutos foram fornecidos em forma de goma que, posteriormente, foram redissolvidos em água e precipitados em etanol gelado por várias vezes e, em seguida, centrifugados em uma centrífuga refrigerada CIENTEC CT-6000R 115 mm centrifuge (10000 g, 20 min, 20°C) para a eliminação de outros resíduos. Por fim, os EPSs foram liofilizados e armazenados a -18°C.

### 2.2 Propriedades físico-químicas dos EPSs

Após a liofilização por 24h os EPSs foram submetidos à análise de Atividade de água (Aa), determinação do pH, análise de açúcares redutores (TAR) e análise de proteínas solúveis do EPSs bruto.

A atividade da água (Aa) do EPS liofilizado foi determinada por leitura direta das amostras em triplicata, utilizando um medidor AquaLab 4TEV de atividade de água.

O pH da solução contendo os EPSs a uma concentração de 10% foi mensurado diretamente, em triplicata, por um medidor de pH Tecnal, usando tampões com valores de pH de 4 e 7 como referências.

O teor de proteína foi verificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o reagente Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250) e albumina bovina como padrão, todos em grau analítico. Inicialmente, preparou-se o reagente de Bradford dissolvendo-se 100mg de Azul de Coomassie em 50mL de etanol 95% e, em seguida, adicionou-se 100mL de ácido fosfórico 85 q.s.p. 1L. A solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo (Whatman nº1) e mantida em geladeira. Após isso, a solução padrão de albumina foi preparada em tampão acetato de sódio 0,05M em pH 4,8, adicionado de NaCl 0,15M. O tampão foi preparado titulando-se acetato de sódio

0,05M com ácido acético 0,05M até pH final de 4,8 e, em seguida, dissolveu-se o NaCl. A partir desta solução-mãe, prepararam-se diluições com concentrações de 4,2µg/mL a 208,0µg/mL.

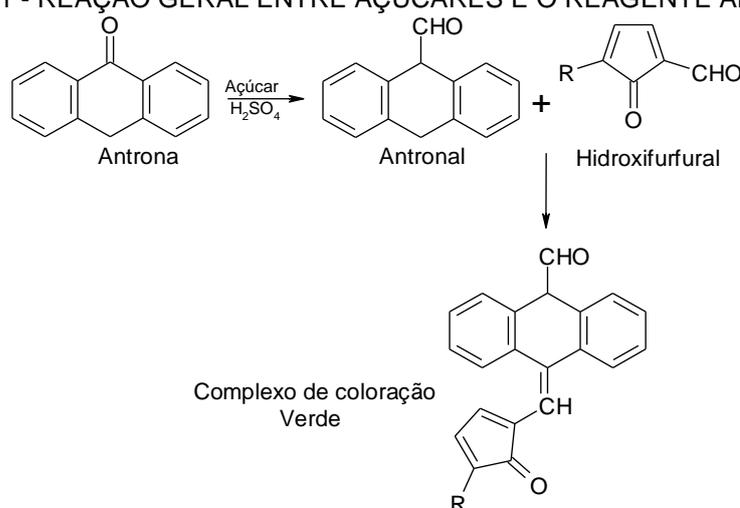
Em tubos de ensaio, volumes de 1mL do reagente de Bradford foram misturados a volumes de 0,1mL de cada uma das diluições da solução-mãe. Em seguida, as respectivas absorbâncias foram determinadas a  $\lambda=595\text{nm}$  em espectrofotômetro, utilizando-se a água no lugar da solução-padrão para análise do branco. As leituras foram realizadas após 2 min e antes de 1h de adição dos reagentes às cubetas.

O Teor de Açúcares Redutores (TAR) foi verificado pelo método de Antrona (YEMM; WILLIS, 1954). Para a quantificação de AST foi utilizado o reagente Antrona (9,10-Dihydro-9-oxoantraceno), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e padrão Glicose, todos em grau analítico. Inicialmente, preparou-se uma solução de glicose na concentração de 60µg/mL. Após isso, preparou-se a solução com o reagente Antrona adicionando-se 40 mg de Antrona a 1 mL de água destilada e, em seguida, 20 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, sob resfriamento.

Para obtenção da curva padrão de glicose, em tubos de ensaio, adicionou-se primeiramente a solução de glicose e em seguida a solução do reagente Antrona. Após isso os tubos foram agitados e levados à banho-maria por 3 minutos a 100°C. Os tubos foram resfriados em banho de gelo e lidos em espectrofotômetro a  $\lambda= 620$  nm.

Na Figura 1 é mostrada a reação entre um açúcar genérico, ou seja, que tenha terminal redutor, e o reagente antrona.

FIGURA 1 - REAÇÃO GERAL ENTRE AÇÚCARES E O REAGENTE ANTRONA.



Fonte: O AUTOR (2018).

### 2.3 Determinação de massas molares dos EPSs

Os ensaios de homogeneidade e determinação de massa molar foram realizados em um Cromatógrafo de Exclusão por Tamanho de Alta Eficiência (CETAE) da Wyatt Technology, equipado com quatro colunas de permeação em gel com limites de exclusão de 7.106, 4.105, 8.104 e 5.103 Da, dispostas em série, um detector de Índice de Refração (IR) modelo Waters 2410 e um detector de Espalhamento de Laser Multiângulos (ELM) a 632,8 nm modelo Dawn DSP. Como eluente utilizou-se uma solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1 mol/L contendo NaN<sub>3</sub> 0,2 g/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min. As amostras foram solubilizadas na solução usada como eluente para uma concentração final de 1 mg/mL e filtradas através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio dos poros de 0,22 µm. Uma quantidade de 200 µL de cada amostra foi injetada e os resultados foram obtidos com o software ASTRA 4.70.07. A obtenção da massa molar foi realizada após a obtenção da taxa de variação do índice de refração em relação à concentração (dn/dc).

A determinação das massas molares foi realizada utilizando-se uma curva de calibração com padrões de dextrana com massas molares variando de 1,17x10<sup>4</sup> a 6,32x10<sup>6</sup> g/mol.

### 2.4 Análise da composição monossacarídica dos EPSs

#### 2.4.1 Hidrólise e acetilação dos EPSs

2 mg de cada EPS foram hidrolizados em ácido Trifluoroacético (TFA) 2M a 100°C por 8h. O excesso do ácido foi removido por evaporação sob fluxo de N<sub>2</sub>. Os produtos hidrolizados foram reduzidos com NaBH<sub>4</sub> à temperatura ambiente por 15h (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Após este período, as soluções reduzidas foram lavadas com metanol e este foi removido por fluxo de N<sub>2</sub>. Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v) (WOLFROM; THOMPSON, 1963b) e aquecidas por 2 h a 100°C. Os derivados acetilados foram extraídos com clorofórmio (500 uL) e solução de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (5%, v/v). Após remoção total da piridina, as frações clorofórmicas foram desidratadas com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e secadas sob fluxo de N<sub>2</sub>.

#### 2.4.2 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-EM) dos alditóis acetilados

Para a análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-EM) utilizou-se um espectrometro Varian Saturn 2000R–3800 acoplado a um espectrômetro de massas Varian Ion-Trap 2000R ITD equipado com coluna capilar de sílica fundida DB- 225 (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 mL/min, como gás de arraste. Os acetatos de alditóis, resultantes dos EPSs hidrolizados e acetilados, foram analisados a uma temperatura de 50 - 220°C (40 °C/min) e os acetatos de alditóis parcialmente metilados a uma temperatura de 50 - 215 °C (40 °C/min). Para os alditóis foi realizada a quantificação relativa, para os quais não se faz necessária curva de calibração. Os alditóis foram identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons no Software Varian (Saturn Workstation 5.1).

#### 2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN unidimensional foram realizadas em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III operando em 9,4 T, observando os núcleos de Hidrogênio e Carbono a 400 MHz e 100 MHz, respectivamente. As amostras foram analisadas em uma sonda de detecção direta (BBO) de 5 mm de diâmetro interno, na temperatura de 70°C. As amostras foram solubilizadas em D<sub>2</sub>O e

aconditionadas em tubos de ressonância de 5 mm para análise. Os deslocamentos químicos foram referenciados com acetona como padrão interno ( $\delta_H/\delta_C$  2.22/33.0 ppm). Os dados obtidos foram analisados no software TopSpin disponibilizado no site da Bruker e comparados com os resultados reportados na literatura.

## 2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o procedimento do modelo linear geral do software OriginPro 8.0 (OriginPro 8 SR0, Copyright©1991-2007, OriginLab Corporation). Todas os experimentos tratados por este software foram replicados 3 vezes.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Análises físico-químicas dos Exopolissacarídeos (EPSs)

Os valores de atividade de água ( $A_w$ ) para o EPS de Soja (EPS<sub>sj</sub>) e o EPS de Leite (EPS<sub>le</sub>) foram 0,21 e  $0,26 \pm 0,01$  a 25°C, respectivamente, sendo classificados por Fennema, Damodaram e Parkin (2010) na Zona A de  $A_w$ . Produtos nesta faixa apresentam boa estabilidade e são resistentes à degradação devido a baixa quantidade de água em sua composição. Botelho et al., (2014) verificaram valores aproximados de  $A_w$  para o EPS obtido da fermentação de extrato de soja por grãos de kefir.

O pH de EPS<sub>sj</sub> e EPS<sub>le</sub> apresentou valores aproximados com pequenas variações ( $\text{pH}_{(\text{EPS}_{\text{sj}})} = 6,02 \pm 0,05$  e  $\text{pH}_{(\text{EPS}_{\text{le}})} = 6,0 \pm 0,05$ ). Esses valores mostram que a solução dos EPSs tem característica ligeiramente ácida que pode ser justificada pela presença de alguns grupos de resíduos de proteínas ligados aos EPSs ou mesmo proteínas residuais após a etapa de extração dos EPSs. Na extração dos EPS, a etapa de precipitação dos mesmos com solventes se faz muito importante para a eliminação de proteínas e monossacarídeos. Azeredo e Oliveira (1996) testaram uma série de volumes e tipos de solventes para a precipitação de EPSs bacterianos, utilizando diferentes volumes de etanol, acetona, propanol, isopropanol, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e 3,5,6 - trifenil - 2,3,5,6 tetraaza biciclo-1-hexeno (nitron) e concluíram que apenas 0,1 volume de nitron precipitou a máxima quantidade de

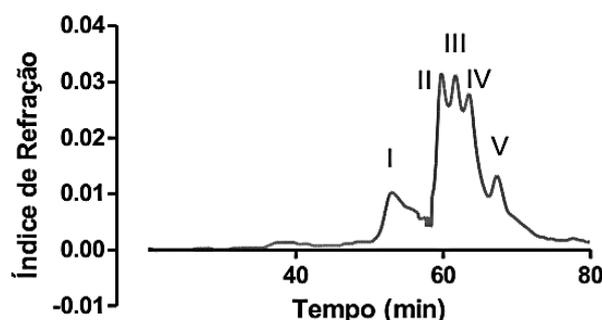
EPS e a segunda melhor precipitação foi com três volumes de propanol ou dois de etanol.

Para a análise de proteína obteve-se aproximadamente 1,5% mg/mL de proteínas solúveis nas amostras, com pequenas variações. Valores semelhantes de conteúdo de proteínas em EPSs obtidos da fermentação de grãos de kefir em extrato de soja foram verificados por Botelho et al., (2014), sendo 2% mg/mL e Liu, Chen e Lin (2002) que obtiveram 2,3% mg/mL. Também, usando o mesmo método, Piermaria et al., (2008) identificaram um baixo teor de proteínas para uma solução de EPS obtido por meio da fermentação de grãos de kefir em leite de vaca.

### 3.2 Determinação de massas molares (CETAE-ELM-IR) e caracterização monossacarídica dos EPSs

Para o EPSsj os resultados obtidos por CETAE-ELM-IR demonstraram uma heterogeneidade molecular com uma alta distribuição de massas quando comparados à curva do padrão dextrana, obtendo-se cinco frações de EPSsj de massa molares (Mw): Pico I:  $1,17 \times 10^4$  g/mol, Pico II:  $1,01 \times 10^3$  g/mol, Pico III:  $5,02 \times 10^2$  g/mol, Pico IV:  $2,35 \times 10^2$  g/mol, Pico V:  $6,32 \times 10^1$  g/mol (Figura 2). Sendo a fração majoritária representada por (I).

FIGURA 2 - PERFIL QUÍMICO OBTIDO POR CETAE-ELM-IR DE EPSsj

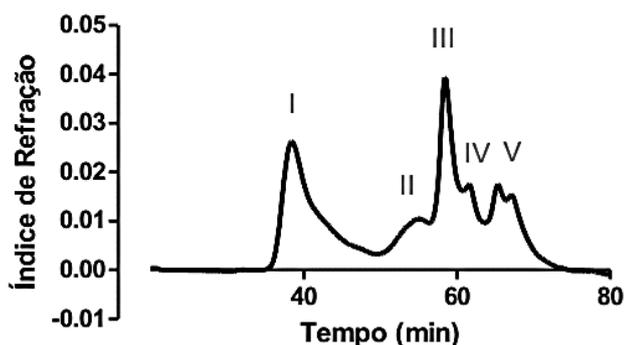


Fonte: O AUTOR (2018)

Para o EPSI e foram observados cinco picos como resultados de CETAE-ELM-IR, indicando heterogeneidade na amostra. As frações em massas molares foram (Mw): Pico I:  $2,22 \times 10^6$  g/mol, Pico II:  $4,36 \times 10^3$  g/mol, Pico III:  $1,51 \times 10^3$  g/mol, Pico IV:  $7,03 \times 10^2$  g/mol, Pico V:  $1,41 \times 10^2$  g/mol, sendo a fração de maior Mw representada por

(I) (Figura 3). Valores de polidispersidade ( $M_w/M_n$ ) assim como medidas da distribuição da massas molares são de alta importancia devido à importância parcialmenencia e influencia significativa da distribuição da massa molar nas propriedades funcionais de polissacarídeos. Ambos os EPSs apresentam massas molares altas o que pode indiciar alto poder geleificante.

FIGURA 3. PERFIL QUÍMICO OBTIDO POR CETAE-ELM-IR DE EPSIe



Fonte: O AUTOR (2018).

As composições monossacarídicas dos EPSs foram medidas pelo método Antrona e por CG-EM. Para o conteúdo de açúcares redutores (TAR) observou-se 11,03% para o EPSIe e 12,21% para o EPSsj o que indica que as amostras são quase em sua totalidade polissacarídeos.

Os resultados obtidos por CG-EM indicaram que o EPSsj é composto, em sua maioria, de moléculas de glicose (79%) e em sua menoria de moléculas de manose (15%) e traços de galactose, arabinose e xilose (Figura 4). Os Espectros de massa referentes a esses monômeros estão representados nas Figuras 5, 6, 7, 8 e 9. Estes são convergentes com os resultados obtidos por Cui et al., 2016 na análise da composição monossacarídica do polissacarídeo intracelular (IPS) produzido pelo fungo comestível *Hericium erinaceus* SG-02, apresentando quantidades semelhantes na composição monossacarídica.

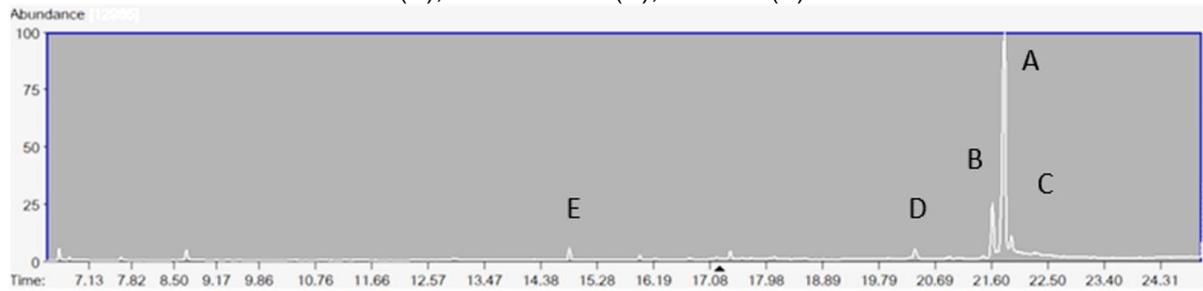
Os valores das fragmentação para unidades glicosídicas para glicose, manose, galactose, xilose e arabinose são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Análise dos acetatos de alditóis do EPSsj por CG-EM.

Açúcares metilados (alditóis acetatos)	Principais fragmentos de massa ( $m/z$ )	Massa molar (g/mol)	Íon molecular [M+23] <sup>+</sup>
1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetil- D-glucitol	375, 289, 259, 233, 217, 170, 145, 139, 127, 115, 103, 85, 73	434	457
1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetil- D-manitol	375, 289, 259, 217, 145, 115, 85, 73, 69	434	457
1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetil- D-galactitol	385, 289, 259, 234, 217, 170, 145, 127, 115, 85, 73	434	457
1,2,3,4,5-penta-O-acetil-D- arabinitol	386, 327, 217, 145, 115, 85, 73, 55	362	385
1,2,3,4,5-penta-O-acetil-D- xilitol	385, 329, 281, 265, 186, 157, 115, 85, 70	362	385

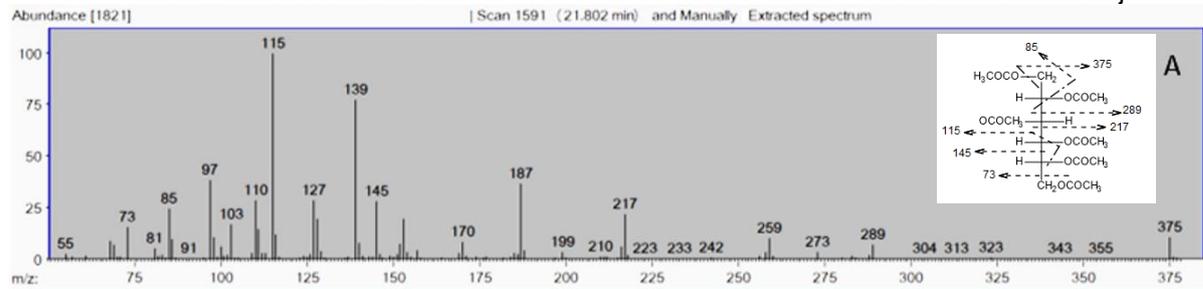
Os valores de fragmentações dos alditóis acetatos  $m/z$  434 [M]<sup>+</sup>, 375 [M-59]<sup>+</sup>, 289, 259, 217, 187, 145, 139, 127, 115, 110, 103, 97, 85 e 73 e para xilose e arabinose  $m/z$  386, 327, 217, 145, 115, 85, 73, 55 também se assemelharam a valores de fragmentações para unidades glicosídicas encontradas por outros autores (CUI et al., 2016; WANG et al., 2017; DI et al., 2017). Outros estudos também mostraram vários EPSs contendo a glicose como unidade majoritária em suas composições (NICHOLS et al., 2004; MORILLO, 2007; HEE; SHOI; KIM; HAN, 2011; NAIK; PANDEY; DUBEY, 2012; ISPIRLI; DERTLI, 2018). Nichols et al., (2004) obteve maior percentual de glicose nos EPSs obtidos de dois isolados de bactérias marinhas de Antártica. Lo, Kang, Wang e Chang (2007) obtiveram em glicose como unidade majoritária em EPSs produzidos por *Lentinula edodes* experimentando nove tipos de condições diferente de fermentação. Hee, Choi, Kim e Han (2011) obtiveram um EPSs que apresentou atividade imunomodulatória composto por 70% de glicose obtido de *Lactobacillus paracasei*. Desta forma, pode-se concluir que estes carboidratos apresentaram várias atividades, dentre elas redução das atividades de transaminases e melhoria dos níveis de lipídios no sangue, incluindo colesterol, triglicerídeos e albumina, revelando os polissacarídeos como protetores para lesões hepáticas (CUI et al., 2016) e ação protetora em organismos imunocomprometidos, além de possuir atividades antioxidantes (HEE; CHOI; KIM; HAN, 2011; HU; JIANG; HUANG; SUN, 2016; ZHANG et al., 2017).

FIGURA 4 - CROMATOGRAMA (CG-EM) DO EPS<sub>Sj</sub>. GLICOSE (A); MANOSE (B); GALACTOSE (C); ARABINOSE (D); XILOSE (E)



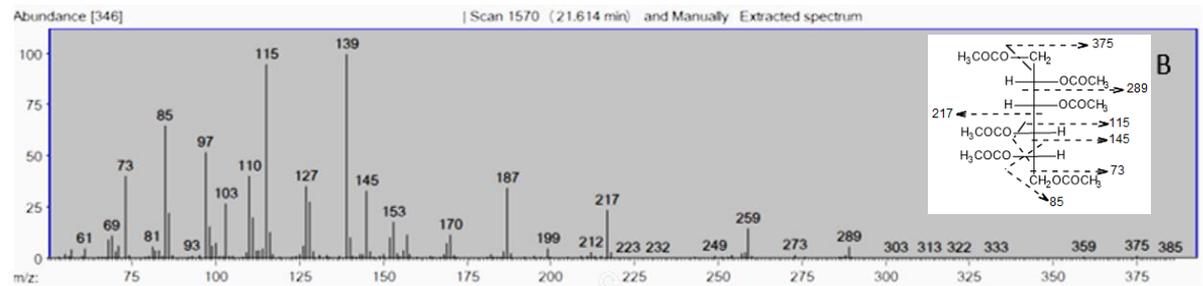
Fonte: O AUTOR (2018).

FIGURA 5 - ESPECTRO DE MASSAS DA GLICOSE DO CROMATOGRAMA DE EPS<sub>Sj</sub>



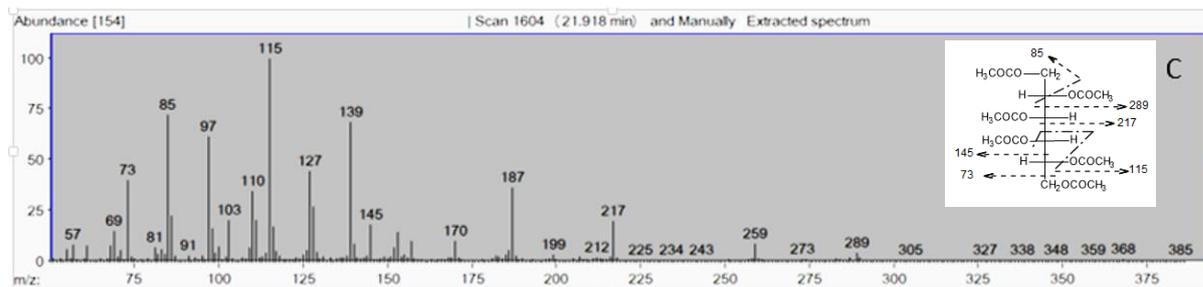
Fonte: O AUTOR (2018).

FIGURA 6 - ESPECTRO DE MASSAS DA MANOSE DO CROMATOGRAMA DE EPS<sub>Sj</sub>



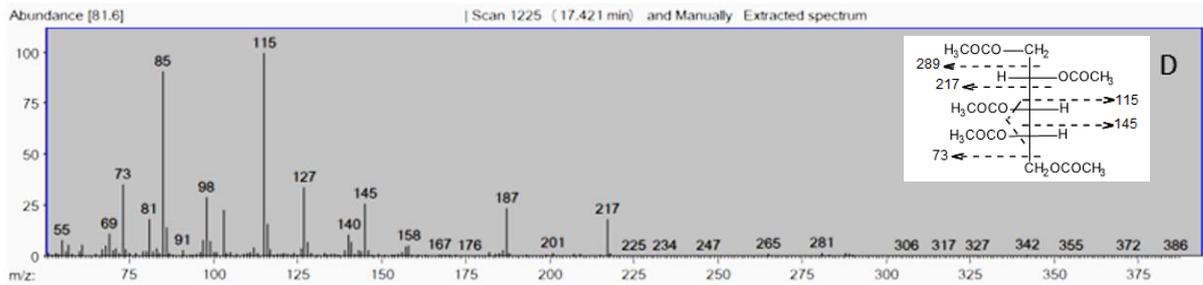
Fonte: O AUTOR (2018).

FIGURA 7 - ESPECTRO DE MASSAS DA GALACTOSE DO CROMATOGRAMA DE EPS<sub>Sj</sub>



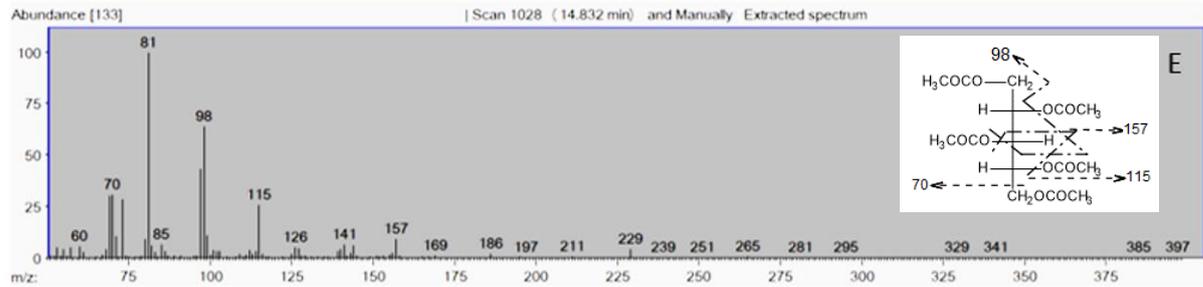
Fonte: O AUTOR (2018).

FIGURA 8 - ESPECTRO DE MASSAS DA ARABINOSE DO CROMATOGRAMA DE EPSsj



Fonte: O AUTOR (2018).

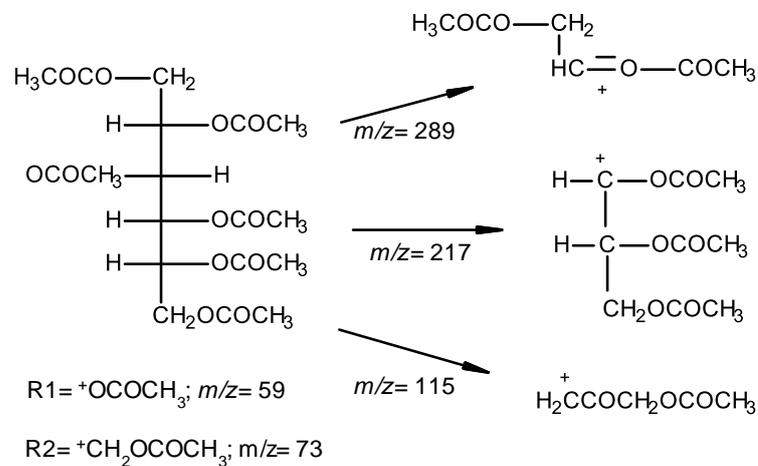
FIGURA 9 - ESPECTRO DE MASSAS DA XILOSE DO CROMATOGRAMA DE EPSsj



Fonte: O AUTOR (2018).

Na Figura 10 é mostrado um esquema da 1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetil-D-glucitol para ilustrar as fragmentações de uma forma geral.

FIGURA 10 - PROPOSTAS DE FRAGMENTAÇÃO PARA A 1,2,3,4,5,6-HEXA-O-ACETIL-D-GLUCITOL



Fonte: O AUTOR (2018).

Para o EPSle os resultados obtidos por CG-EM revelaram que o EPS é composto, em sua maioria, de galactose (56%), seguido de glicose (40%) e, em sua minoria de ramnose (4%) (Figura 11). Embora tenham sido identificados os mesmos monômeros no EPSle pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  e  $^1\text{H}$ , os valores das quantificações não foram correspondentes quando comparado os resultados da CG com a RMN do EPSle. Atribui-se a isso a pouca solubilidade que esta amostra apresentou durante o preparo dos produtos acetilados e a grande quantidade de impurezas que o EPS bruto do leite apresentou.

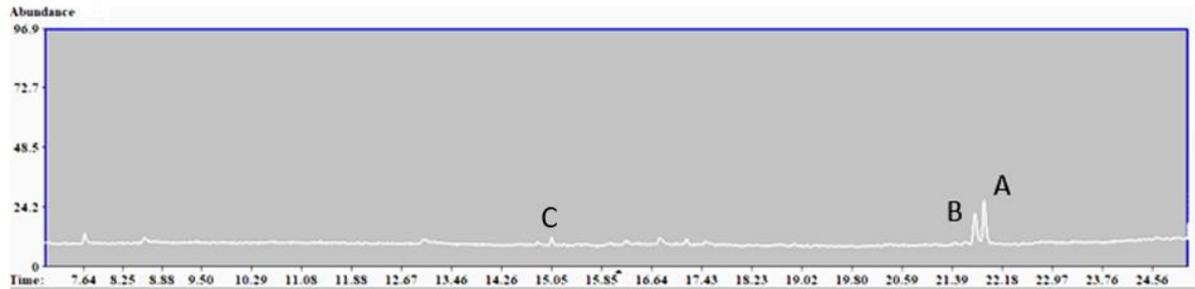
Os Espectros de massa referentes a esses monômeros estão representados nas Figuras 12, 13 e 14, Os valores de  $m/z$  estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise dos acetatos de alditóis do EPSle por CG-EM.

Açúcares metilados (alditóis acetatos)	Principais fragmentos de massa ( $m/z$ )	Massa molar (g/mol)	Íon molecular [M+23] <sup>+</sup>
1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetyl- D-glucitol	375, 289, 259, 233, 217, 170, 145, 139, 127, 115, 103, 85, 73	434	457
1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetyl- D-manitol	375, 289, 259, 217, 145, 115, 85, 73, 69	434	457
1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetyl- D-galactitol	385, 289, 259, 234, 217, 170, 145, 127, 115, 85, 73	434	457
1,2,3,4,5-penta-O-acetyl- D-arabinitol	386, 327, 217, 145, 115, 85, 73, 55	362	385
1,2,3,4,5-penta-O-acetyl- D-xilitol	385, 329, 281, 265, 186, 157, 115, 85, 70	362	385

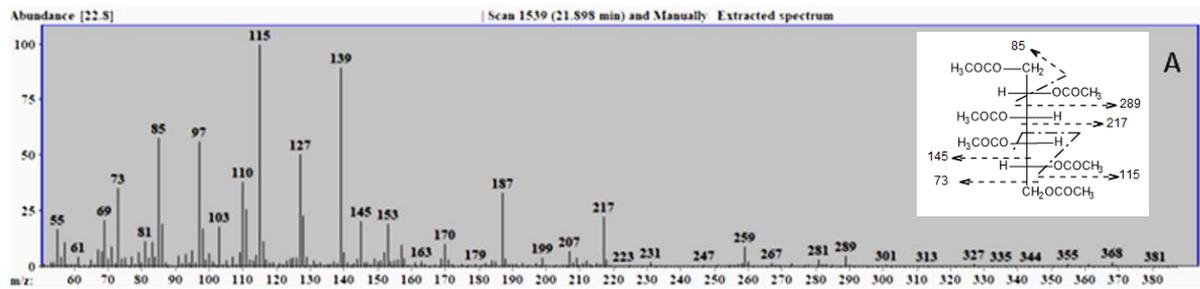
Os valores percentuais relativos de CG verificados para o EPSle sugeriu que a sua composição assemelha-se kefirano, EPS produzido pela fermentação de kefir em leite de vaca (LA RIVIÈRE et al., 1967; KOOIMAN, 1968; FRENGOVA et al., 2002; FARNWORTH; MAINVILLE, 2008; ZAJŠEK; ROLAR; GORŠEK, 2011). Mas, como dito anteriormente, as dificuldades enfrentadas de preparo da amostra, nesta primeira análise, divergiu dos resultados da análise por RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  e  $^1\text{H}$ . Resultados estes mais confiáveis devido a adaptação dos procedimentos para melhor resultado da análise estrutural.

FIGURA 11 - CROMATOGRAMA (CG-EM) DO EPSIe. GALACTOSE (A); GLICOSE (B); RAMNOSE (C)



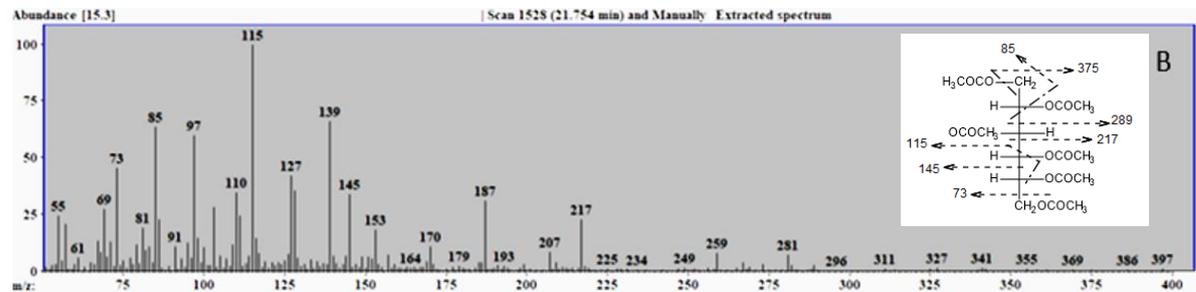
Fonte: O AUTOR (2018).

FIGURA 12 - ESPECTRO DE MASSAS DA GALACTOSE DO CROMATOGRAMA DE EPSIe



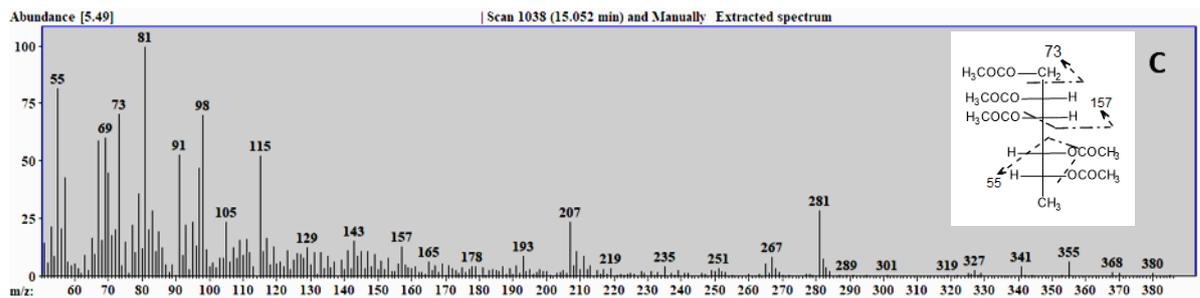
Fonte: O AUTOR (2018).

FIGURA 13 - ESPECTRO DE MASSAS DA GLICOSE DO CROMATOGRAMA DE EPSIe



Fonte: O AUTOR (2018).

FIGURA 14 - ESPECTRO DE MASSAS DA RAMNOSE DO CROMATOGRAMA DE EPSIe

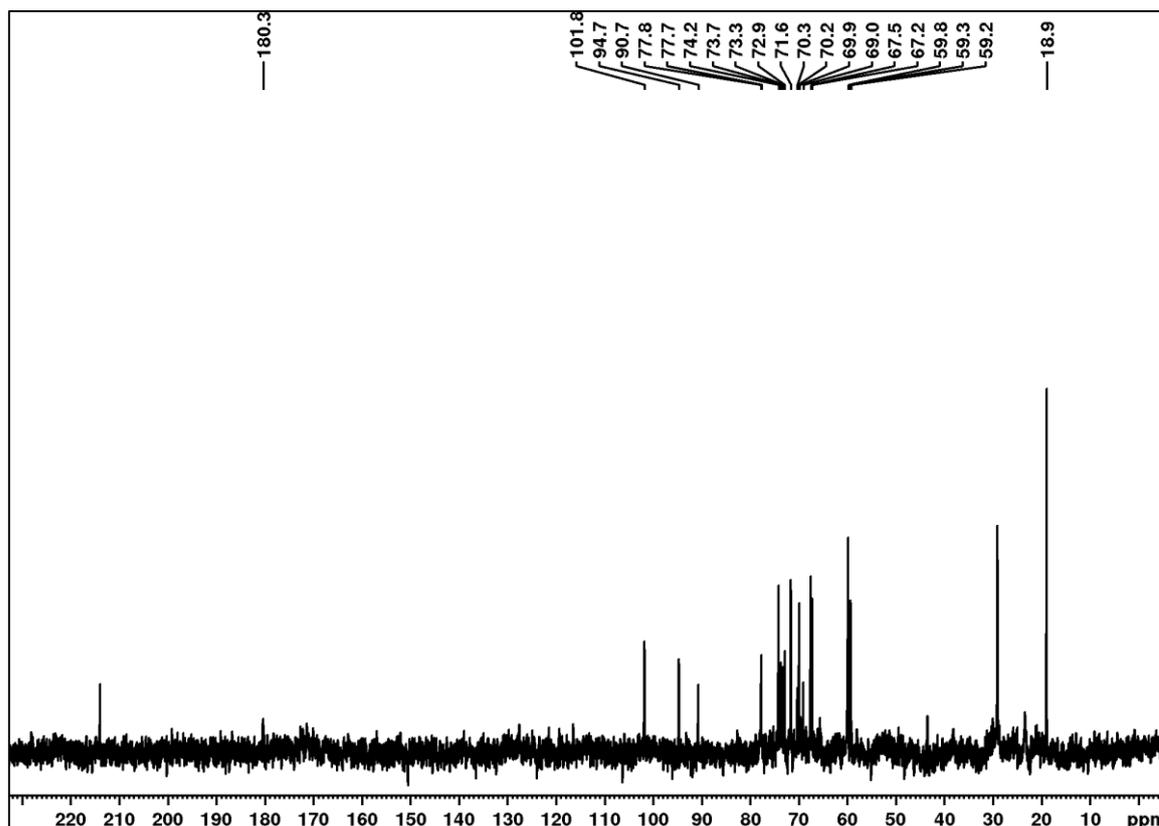


Fonte: O AUTOR (2018).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  (Figura 15a) de EPSle mostra sinais de carbonos entre  $\delta_{\text{C}}$  15 e 220. Este intervalo indica sinais característicos de polímeros que contem carbonos em anéis glicosídicos com e sem substituições (FABER et al., 2001; KACZYNSKI et al., 2006; MAO; SHI; WU; XU, 2014; YANG et al., 2018).

Pode-se observar três sinais característicos de carbono anomérico em  $\delta_{\text{C}}$  101,8; 94,7 e 90,7. A presença de lactose foi observada com sinais em  $\delta_{\text{C}}$  94,7 e 90,7 característicos de  $\alpha,\beta\text{-Glc}_p$  (DERTLI et al., 2013; CAO; PENG; CUI, 2013; MAO; SHI; WU; XU, 2014) e os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  101,8; 94,7 e 90,7 correspondem a C-1 e C-4 das unidades de  $\beta\text{-Gal}_p$  e O-4 de  $\text{Glc}_p$ , respectivamente (LI et al., 2015; YANG et al., 2018; DERTILI et al., 2013). O sinal observado em  $\delta_{\text{C}}$  18,9 é característico de carbono do grupo metila, indicando a presença de ramnose na composição do EPS. Sinais característicos de carbonos do grupo metila encontram-se na região entre  $\delta_{\text{C}}$  15 e 30 (GANESHAPILLAI et al., 2008; LUNDQVIST, 2015; PRECHTL; WEFERS; JAKOB; VOGEL, 2018).

Pode-se observar um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  29,03, característico de outro carbono de metila que pode ser atribuído a metila de um aminoácido, podendo ser sugerido o aminoácido alanina (DROUILLARD et al., 2018). Este sinal corrobora com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  180. Sinais na faixa entre  $\delta_{\text{C}}$  165-185 são característicos de carbonos de carbonila, indicando a presença de grupo ácido de aminoácidos (CHEN et al., 2014; SUN et al., 2018; PRECHTL; WEFERS; JAKOB; VOGEL, 2018).

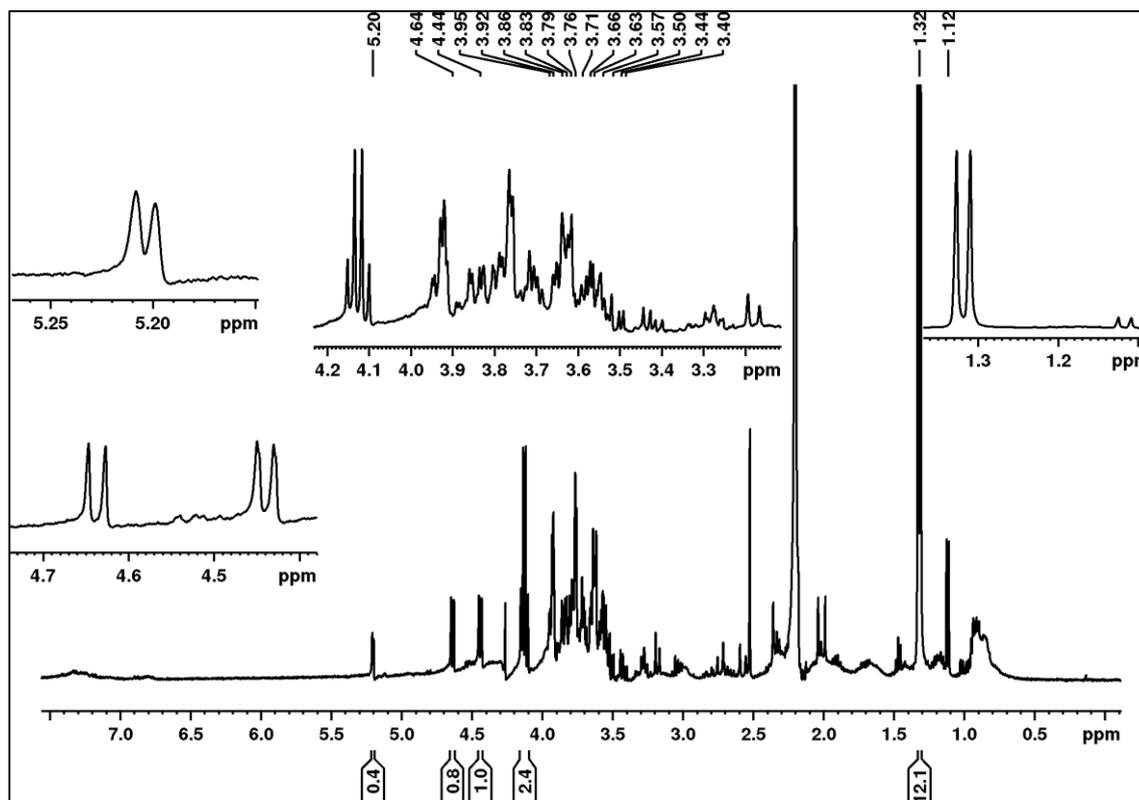
FIGURA 15a - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) DE EPSIe

Fonte: O AUTOR (2018).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EPSIe (Figura 15b) foram observados sinais característicos de polissacarídeos em torno de  $\delta_{\text{H}}$  5,07 e 3,48 (YANG et al., 2018; NEP; CONWAY, 2010).

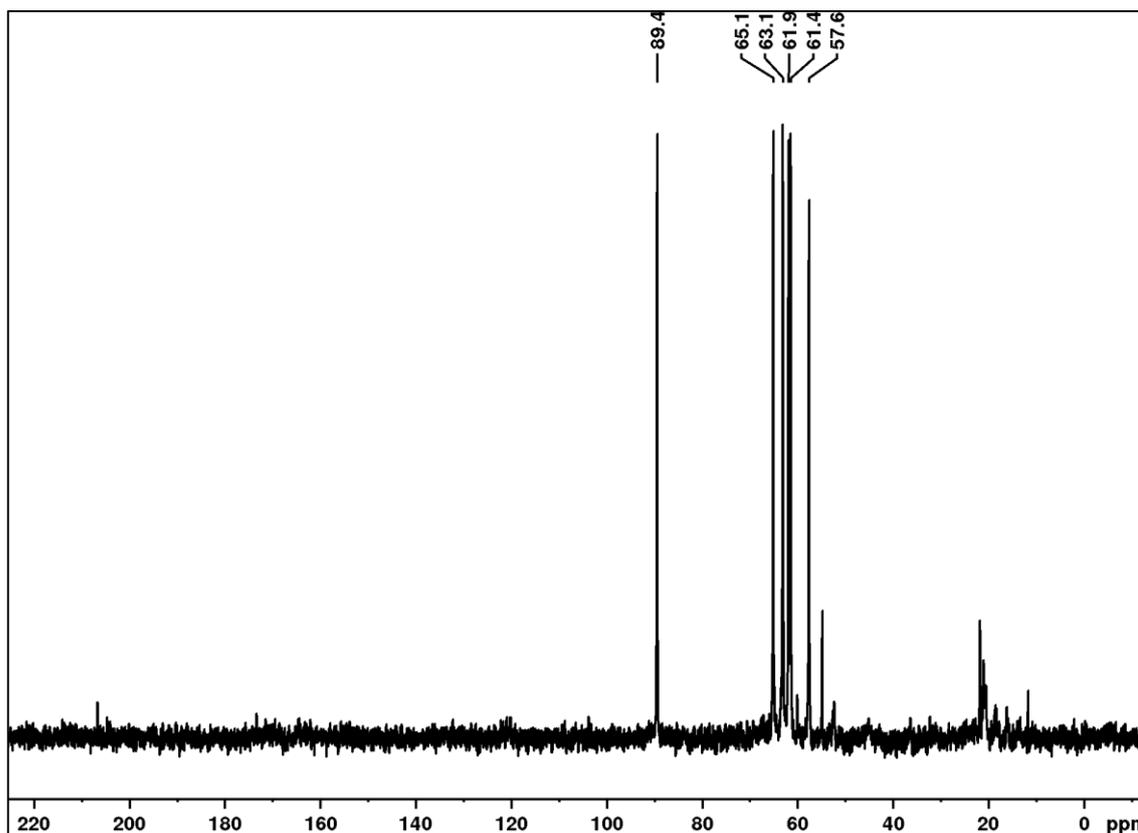
De acordo com a literatura foi possível observar no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  três sinais característicos de hidrogênios ligados a carbono anoméricos, integrando para 1:0.8:0.4. Os sinais de hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4,50 ( $d$ ,  $J = 7,9$  Hz) corresponde a glicose com 45,5%, em  $\delta_{\text{H}}$  4,30 ( $d$ ,  $J = 7,7$  Hz) corresponde a ramnose com 36,3% e o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,06 ( $d$ ,  $J = 3,9$  Hz) é referente a galactose com 18,1%. Esses sinais são correspondentes aos sinais no espectro de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  94,7 e 90,7; 18,9 e 101,8, comprovando a presença de três unidades de açúcares. Valores de deslocamentos químicos mais blindados entre  $\delta_{\text{C}}$  95 – 101 e  $\delta_{\text{H}}$  4,3 – 4,8 mostram que a posição do grupo substituinte está em configuração alfa ( $\alpha$ ) e o menos blindado entre  $\delta_{\text{C}}$  101 – 105 e  $\delta_{\text{H}}$  4,9 – 5,5 está em configuração beta ( $\beta$ ) (NEP; CONWAY, 2010; MA; YUAN; ZHUANG, 2018; YANG et al., 2018). Desta forma, pode-se concluir que com os valores de  $\delta_{\text{C}}$  94,7 e 90,7 e  $\delta_{\text{H}}$  4,5 e 4,3 os substituintes estão ligados em posição alfa ( $\alpha$ ) e os valores de deslocamento em  $\delta_{\text{C}}$  101,8 e  $\delta_{\text{H}}$  5,06 indicam que a ligação ocorre

em posição beta ( $\beta$ ). Pode-se observar a presença da unidade de ramnose dentre os açúcares com um duplete em  $\delta_H$  1,12 ( $J = 6,7$  Hz), sinal típico de grupos  $-CH_3$  de deoxi-açúcares que faz realção com um sinal em  $\delta_C$  18,9 no espectro de carbono (NEP; CONWAY, 2010; MARSON-ASCÊNCIO; ASCÊNCIO; BAGGIO, 2012; RAVENSCROFT et al., 2015; RODRÍGUEZ-CARVAJAL et al., 2008; DONG; LI; MIN, 2018; PRECHTL; WEFERS; JAKOB; VOGEL, 2018). Podemos, ainda, observar a presença do sinal em  $\delta_H$  1,32 que pode ser atribuído a grupos  $-CH_3$  de substituintes não osídeos, como hidrogênios de aminoácidos e  $\delta_H$  2,18 de grupos  $-CH_3$  de acetil, que pode ser confirmado através do sinal em  $\delta_C$  29,0 no espectro RMN  $^{13}C \{^1H\}$ . Estes valores foram semelhantes aos valores encontrados por Maalej et al., (2014) no estudo estrutural do EPSs produzido por *Pseudomonas stutzeri* AS22. Podemos confirmar a presença de aminoácidos com o sinal em  $\delta_C$  180,3 presente no espectro de RMN de  $^{13}C \{^1H\}$ , característico de carbonilas (CHEN et al., 2014; SUN et al., 2018; PRECHTL; WEFERS; JAKOB; VOGEL, 2018). Os valores encontrados nos espectros de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C \{^1H\}$  convergem com os valores descritos por Polak-Berecka et al., (2015) sugerindo que a estrutura do EPSle é formada por unidades de  $\alpha$ -glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -ramp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -galp.

FIGURA 15b - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) DE EPSIe

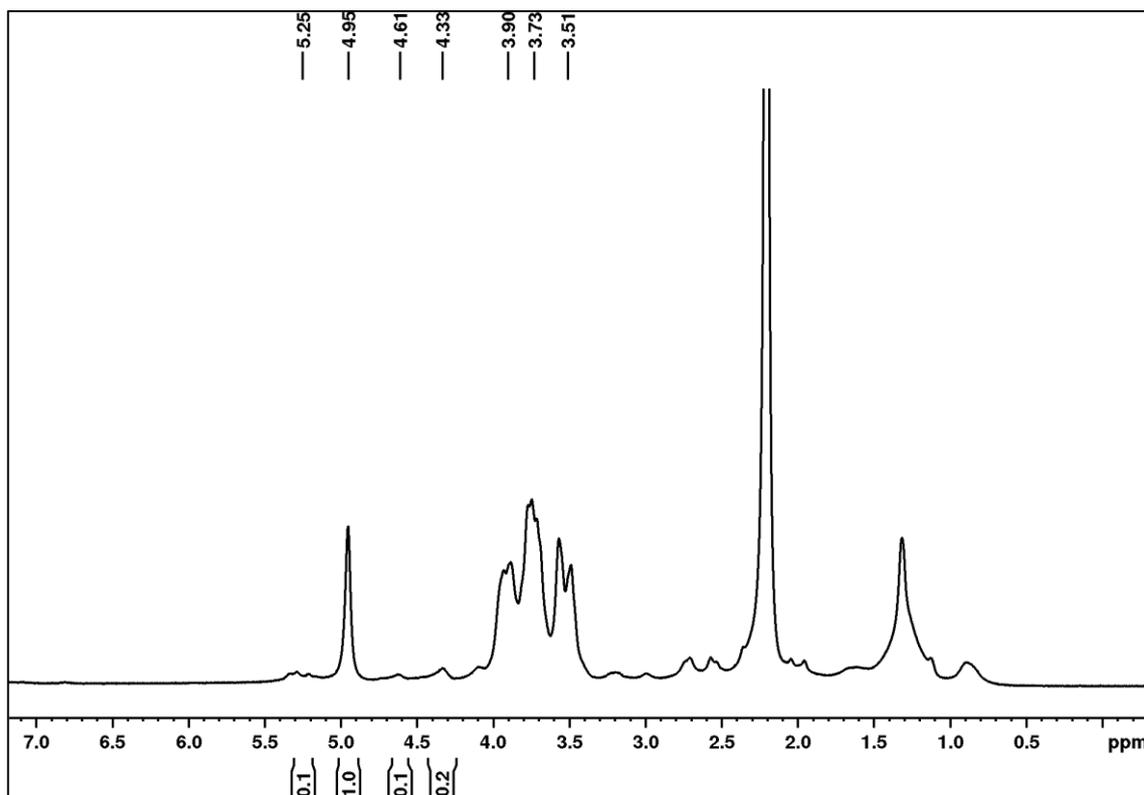
Fonte: O AUTOR (2018).

Para o EPSsj identificou-se um homopolissacarídeo de glicose formado por unidades de  $\alpha\text{-Glc}_p$  ligadas, devido à presença do único sinal de carbono anomérico em  $\delta_c$  89,4 (C-1) (Figura 16a). Os sinais entre  $\delta_c$  57 e 66 referem-se aos outros carbonos presentes no anel glicosídico (CAO; PENG; CUI, 2013; MAO; SHI; WU; XU, 2014; CHAKRABORTY; SWARBHANU; SEM; PAL, 2015; DONG; LI; MIN, 2018; KAVITAKE; DEVI; SINGH; SHETTY, 2016).

FIGURA 16a - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) DE EPSsj

Fonte: O AUTOR (2018).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 16b) corrobora com os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  (Figura 16a), pois a presença de um simpleto na região anomérica em  $\delta_{\text{H}}$  4,95 é característico de unidades de  $\alpha\text{-Glc}_p$  O-ligadas (DONG; LI; MIN, 2018; KAVITAKE, D; DEVI; SINGH; SHETTY, 2016; DONG et al., 2013). Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,25, 4,61 e 3,51 são referentes às outras unidades de açúcares que podem ser relacionadas aos resultados obtidos na CG-EM, referindo-se a galactose, arabinose e xilose. Sugere-se que devido a baixa quantidade essas moléculas podem estar ligadas por poucas unidades de ramificações na cadeia principal. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,31 é referente a grupos  $-\text{CH}_3$  de substituintes não osídeos, como hidrogênios de aminoácidos e o sinal próximo a  $\delta_{\text{H}}$  2,0 pode ser atribuído a grupos  $-\text{CH}_3$  de acetil. Valores semelhantes foram reportados por Drouillard et al., (2015) ao analisarem a estrutura do EPS produzido por *Vibrio alginolyticus*. De acordo com os estudos realizados por CHAKRABORTY; SARKAR; SEM; PAL, (2015) ao analisar o EPS produzido pela cianobactéria *Leptolyngbya tenui* os valores obtidos indicam que o EPSsj é um homopolímero composto de moléculas de  $\alpha$ -glicose ligadas-(1 $\rightarrow$ 4).

FIGURA 16b - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) DE EPSsj

Fonte: O AUTOR (2018).

#### 4 CONCLUSÃO

Neste estudo, o EPS isolado do extrato de soja apresentou a maior fração com massa molar  $1.17 \times 10^4$  g/mol. Este EPS em sua maioria é composto de moléculas de glicose, sendo formado por unidades de  $\alpha\text{-Glc}$  ligadas-(1,4). Pode-se observar que o EPS obtido do fermentado de leite bovino apresentou maior fração com massa molar  $2,22 \times 10^6$  g/mol. Este EPS é constituído de moléculas de glicose, ramnose e galactose na formação  $\alpha\text{-glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-ramp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-galp}$ . Até o momento estes EPSs ainda não haviam sido estudados nem reportados na literatura, suas características e estrutura molecular se assemelham a de outros EPSs já estudados e comercializados. Isto indica que estes EPSs possuem grande potencial para uso industrial como espessantes e/ou estabilizantes, assim como podem apresentar atividades biológicas em estudos posteriores.

## REFERÊNCIAS

AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. A New Method for Precipitating Bacterial Exopolysaccharides. **Biotechnology Techniques**, v.10, n.5, p.341-344, 1996.

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

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUBB, W. A. NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity. **Carbohydrate NMR Primer**, p.1-19, 2006.

CAO, C-L.,1 PENG, F.; CUI, B-K. Chemical Characterization and Structure of Exopolysaccharides from Submerged Culture of New Medicinal Mushroom from China, *Phellinus mori* (*Higher Basidiomycetes*). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.15, n.1, p.57–69, 2013.

CHAKRABORTY, T.; SARKAR, S.; SEM, A. K.; PAL, R. Extracellular Polysaccharides of the cyanobacterium- *Leptolyngbya tenuis*: Structural characterization and its compositional changes during stress exposure. **International Journal of Advanced Research**, v.3, n.11, p.15 – 39, 2015.

CHEN, X.; DING, Z-Y.; WANG, W-Q.; SIU, K-C.; WU, J-Y. An antioxidative galactomannan–protein complex isolated from fermentation broth of a medicinal fungus *Cs-HK1*. **Carbohydrate Polymers**, v.112, p. 469–474, 2014.

CUI, F.; GAO, X.; ZHANG, J.; LIU, M.; ZHANG, C.; XU, N.; ZHAO, H.; LIN, L.; ZHOU, M.; JIA, L. Protective Effects of Extracellular and Intracellular Polysaccharides on Hepatotoxicity by *Hericium erinaceus* SG-02. **Current Microbiology**. v.73, p.379–385, 2016.

DERTILI, E.; COLQUHOUN, I. J.; GUNNING, A. P.; BONGAERTS, R. J.; GALL, G. L.; BONEV, B. B.; MAYER, M. J.; NARBAD, A. Structure and Biosynthesis of Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, n.44, p.31938–31951, 2013.

DONG, J.; LI, H.; MIN, W. Preparation, characterization and bioactivities of *Athelia rolfsii* exopolysaccharide-zinc complex (AEPS-zinc). **International Journal of Biological Macromolecules**, v.113, p.20–28, 2018.

DONG, Q.L.; LIN, T.Y.; XING, X.Y.; CHEN, B.; HAN, Y. Identification of a symbiotic fungus from blue–green alga and its extracellular polysaccharide. **Letters in Applied Microbiology**, v.58, p.303–310, 2013.

DROUILLARD, S.; JEACOMINE, I.; BUON, L.; BOISSET, C.; COURTOIS, A.; THOLLAS, B.; MORVAN, P-Y.; VALLÉE, R.; HELBERT, W. Structure of an Amino Acid-Decorated Exopolysaccharide Secreted by a *Vibrio alginolyticus* Strain. **Marine Drugs**, v. 13, p. 6723-6739, 2015.

DROUILLARD, S.; JEACOMINE, I.; BUON, L.; BOISSET, C.; COURTOIS, A.; THOLLAS, B.; MORVAN, P-Y.; VALLÉE, R.; HELBERT, W. Structure of the Exopolysaccharide Secreted by a Marine Strain *Vibrio alginolyticus*. **Marine Drugs**, v. 16, p. 1-12, 2018.

DUBOC, P.; MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides. **International Dairy Journal**, v.11, p.759-768, 2001.

FABER, E. J.; VAN DEN HAAK, M. J.; KAMERLING, J. P.; Vliegenthart, J. F. G. Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. **Carbohydrate Research**, v.331, p.173–182, 2001.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. Kefir: A Fermented Milk Product. **Handbook of fermented functional foods**, 2003.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. **Kefir - A Fermented Milk Product. Handbook of Fermented Functional Foods**, Second Edition, 2008.

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

FERREIRA, C. L. L. F. Quefir Como Alimento Funcional. **Alimentos Funcionais – Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. Editora Rubio Ltda, Rio de Janeiro, 2010.

FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BRESHKOVA, D. M.; SIMIV, Z. I. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. **Z. Naturforsch**, v.57, p.805-810, 2002.

GANESHAPILLAI, J.; VINOGRADOV, E.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S.; MONTEIRO, A. Clostridium difficile cell-surface polysaccharides composed of pentaglycosyl and hexaglycosyl phosphate repeating units. **Carbohydrate Research**, v.343, p.703 – 710, 2008.

HEE, K.; SHOI, H. S.; KIM, J. E.; HAM, N. S. Exopolysaccharide-Overproducing *Lactobacillus paracasei* KB28 Induces Cytokines in Mouse Peritoneal Macrophages via Modulation of NF- $\kappa$ B and MAPKs. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, n.11, p.1174–1178, 2011.

HU, T.; JIANG, C.; HUANG, K.; SUN, F. A comb-like branched -d-glucan produced by a *Cordyceps sinensis* fungus and its protective effect against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. **Carbohydrate Polymers**, v.142, p.259–267, 2016.

IMESON, A. **Food Stabilisers Thickeners and Gelling Agents**. WILEY-BLACKWELL, 2010.

ISPIRLI, H.; DERTLI, E. Isolation and identification of exopolysaccharide producer lactic acid bacteria from Turkish yogurt. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.42, p.1-8, 2018.

GHALY, A. E.; ARAB F.; MAHMOUD N. S.; HIGGINS, J. Production of Levan by *Bacillus licheniformis* for Use as a Soil Sealant in Earthen Manure Storage Structures. **American Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v.3, n.2, p.47-54, 2007.

JUNGBUNZLAUER, Disponível em: <<http://www.jungbunzlauer.com/products-applications/applications.html>> Acesso em Agosto de 2012.

KACZYNSKI, Z.; KARAPETYAN, G.; EVIDENTE, A.; IACOBELLIS, N. S.; HOLST, O. The structure of a putative exopolysaccharide of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola*. **Carbohydrate Research**, v.341, p.285–288, 2006.

KAVITAKE, D.; DEVI, P. B.; SINGH, S. P.; SHETTY, P. H. Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confuse* KR780676 from an acidic fermented food. **International Journal of Biological Macromolecules** v.86, p.681–689, 2016.

KHAN, T.; PARK, J. K.; KWON, J. H. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.24, n.5, p.816-826, 2007.

KNEIFEL, W.; MAYER, H. K. Vitamin profiles of kefir made from milks of different species. **International Journal of Food Science & Technology**, v.26, n.4, p.423–428, 1991.

KOOIMAN, P. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. **Carbohydrate Research**, v.7, p.220-221, 1968.

KOROLEVA, N. S. Technology of kefir and kumys. **Bulletin International Dairy Federation**, v.227, p.96, 1988.

LA RIVIÈRE, J. W. M.; KOOIMAN, P.; SCHMIDT, K. kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. **Archives fur Mikrobiologie**, v.59, p.269-278, 1967.

LI, W.; XIA, X.; TANG, W.; JI, J.; RUI, X.; CHEN, X.; JIANG, M.; ZHOU, J.; ZHANG, Q.; DONG, M. Structural Characterization and Anticancer Activity of Cell-Bound Exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p.3454–3463, 2015.

LO, T. C. T.; KANG, M. W.; WANG, B. C.; CHANG, C. A. Glycosyl linkage characteristics and classifications of exo-polysaccharides of some regionally different strains of *Lentinula edodes* by amplified fragment length polymorphism assay and cluster analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.592, p.146–153, 2007.

LI, W.; XIA, X.; TANG, W.; JI, J.; RUI, X.; CHEN, X.; JIANG, M.; ZHOU, J.; ZHANG, Q.; DONG, M. Structural Characterization and Anticancer Activity of Cell-Bound Exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p.3454–3463, 2015.

LIU, J. R.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. **Journal of food science**, v.67, n.1, p.104 – 108, 2002.

LUNDQVIST, L. **Structural and Interaction Studies of Polysaccharides by NMR Spectroscopy**. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2015.

MA, Q.; YUAN, L.; ZHUANG, Y. Preparation, characterization and in vivo antidiabetic effects of polysaccharides from *Pachyrrhizus erosus*, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.114, p. 97–105, 2018.

MAALEJ, H.; BOISSET, C.; HMIDET, N.; BUON, L.; HEYRAUD, A.; NASRI, M. Purification and structural data of a highly substituted exopolysaccharide from *Pseudomonas stutzeri* AS22. **Carbohydrate Polymers**, v.112, p.404–411, 2014.

MAEDA, H.; MIZUMOTO, H.;SUZUKI, S.; SUZUKI, K.; KITAMURA, S.M. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) from *Lactobacillus kefiranofaciens* on blood glucose in KKAY mice and constipation in SD rats induced by low-fiber diet. **Bioscience Microflora**, v.23, n.4, p.149-153, 2005.

MARSON-ASCÊNCIO, P. G.; ASCÊNCIO, S. D.; BAGGIO, S. F. Z. SOLAMENTO E ANÁLISE QUÍMICA PARCIAL DE EXOPOLISSACARÍDEOS DA DIATOMÁCEA MARINHA CULTIVADA *Coscinodiscus wailesii* (*Coscinodiscales*, *Bacillariophyta*). **Química Nova**, v.35, n.8, p.1542-1548, 2012.

MAO, D-B.; SHI, C-W.; WU, J-Y.; XU, C-P. Optimization of exopolysaccharide production in submerged culture of *Daedalea dickinsii* and its antioxidant activity. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v.37, p.1401–1409, 2014.

MOREIRA, E. C. M.; SANTOS, M. H. PEREIRA, I. FERRAZ, V.; BARBOSA, L. C. A. e SCHNEEDORF, J. M. Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de kefir. **Química Nova**. V.31, n.7, p.1738-1742, 2008.

MORILLO, A. J.; ÁGUILA, V. G.; AGUILERA, M.; RAMOS-CORMENZANA, A.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. Production and characterization of the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae* grown on olive mill-waste waters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.1705–1710, 2007.

NAIK, M. M.; PANDEY, A.; DUBEY, S. K. Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. **Biodegradation**, v.23, p.775–783, 2012.

NEP, E. I.; CONWAY, B. R. Characterization of Grewia Gum, a Potential Pharmaceutical Excipient. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v.1, n.1, p.30-40, 2010.

NICHOLS, C. A. M.; GARON, S.; BOWMAN, J.P.; RAGUÉNÈS, G.; GUÉZENNEC, J. Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.1057–1066, 2004.

NOSHLY. ©2011-2018 Noshly Pty. Ltd, 2018. Acessado em setembro de 2018 em: <https://noshly.com/additive/424/firming-agent-plus/424/#.W607i2hKjIV>

OTLES, S.; CAGINDI, O. kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.2, p.54-59, 2003.

PAIVA, I. M. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR LACTOBACILOS ISOLADOS DE KEFIR. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

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

PRECHTL, R. M.; WEFERS, D.; JAKOB, F.; VOGEL, R. F. Structural characterization of the surface-associated heteropolysaccharide of *Lactobacillus plantarum* TMW 1.1478 and genetic analysis of its putative biosynthesis cluster. **Carbohydrate Polymers**, v.202, p.236–245, 2018.

POLAK-BERECKA, M.; CHOMA, A.; WASKO, A.; GÓRSKA, S.; GAMIAN, A.; CYBULSKA, J. Physicochemical characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* on various carbon sources, **Carbohydrate Polymers**, v.117, p.501–509, 2015.

RAU, U.; KUENZ, A.; WRAY, V.; NIMITZ, M.; WRENGER, J.; CICEK, H. Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes (Coriolus) versicolor* ATCC 200801. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, p.827–83, 2009.

Ravenscroft, N.; Haeuptle, M. A.; Kowarik, M.; Fernandez, F. S.; Carranza, P.; Brunner, A.; Steffen, M.; Wetter, M.; Keller, S.; Ruch, C.; Wacker, M. Purification and characterization of a *Shigella* conjugate vaccine, produced by glycoengineering *Escherichia coli*. **Glycobiology**, v. 26, n. 1, p. 51–62, 2016.

REHM, B. Alginates: Biology and applications. **Springer Verlag**, v.13, 2009.

RIMADA, P. S.; ABRAHAM, A. G. Kefiran improves rheological properties of glucono-D-lactone induced skim milk gels. **International Dairy Journal**, v.16, p.33–39, 2006.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; 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.

RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; SÁNCHEZ, J. I.; CAMPELO, A. P.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A.; GIL-SERRANO, A. M. Structure of the high-molecular weight exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus pentosus* LPS26. **Carbohydrate Research**, v.343, p.3066–3070, 2008.

ROLLER, S.; DEA, I.C.M. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.2, p.261-277, 1992.

ROTTAVA, I.; BATESINI G.; SILVA, M. F.; LERIN, L.; DE OLIVEIRA, D.; PADILHA, BF. F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R. L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas sp.* **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.65–71, 2009.

SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. **British Food Journal**, v.110, n.3, p.283-295, 2008.

SILVA, M. L. C; MARTINEZ, P.F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE GLUCANAS FÚNGICAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. **Química Nova**, v.29, n.1, p.85-92, 2006.

SUN, Y.; ZHANG, J.; WANG, H.; WANG, T.; CHENG, H.; YU, B.; OLIVEIRA, C. Sulfate dodecyl sodium-induced stability of a model intrinsically disordered protein, bovine casein. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 19-28, 2018.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnology**, v.16, n.1, p.41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Biotechnology of Microbial Polysaccharides. Cambridge Studies. **Biotechnology 9**. Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1990.

VINDEROLA, G., PERDIGO, G.; DUARTE, J.; FARNWORTH, E.; CHANTAL MATAR. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity. **Cytokine**, v.36, p.254–260, 2006.

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

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.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 65-67, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 211-215, 1963b.

YANG, Y.; FENG, F.; ZHOU, Q.; ZHAO, F. DU, R.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Isolation, Purification, and Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Leuconostoc Citreum*N<sub>21</sub> from Dried Milk Cake, **Transactions of Tianjin University**, 2018.

YANG, S-T. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. **Elsevier Science**, 1 st Edition, p. 569, 2011.

YEMM, E. W.; WILLIS, B. F. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, n.3, 1954.

XU, Z.; GUO, Q.; ZHANG, H.; WU, Y.; HANG, X.; AI, L. Exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S-3: Molecular, partial structural and rheological properties. **Carbohydrate Polymers**, v.194, p.132-138, 2018.

ZAJŠEK, K.; KOLAR, M.; GORŠEK, A. Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains international journal of dairy technology. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.4, p.544-548, 2011.

ZHANG, H.; WANG, X.; LI, R.; SUN, X.; SUN, S.; LI, Q.; XU, C. Preparation and Bioactivity of Exopolysaccharide from an Endophytic Fungus *Chaetomium* sp. of the Medicinal Plant *Gynostemma Pentaphylla*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n.51, p.477-482, 2017.

ZHOU, Q.; FENG, F.; YANG, Y.; ZHAO, F.; DU, R.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.107, p.2234–2241, 2018.

## 4. CAPÍTULO 2

### **Caracterização e comportamento térmico de dois exopolissacarídeos obtidos dos fermentados de grãos de kefir em extrato de soja e leite**

Priscilla de Sousa BOTELHO<sup>a\*</sup>; Magali da Silva AMORIM<sup>b</sup>, Gabriel Olivo LOCATELLI<sup>a</sup>, Maria de Fátima F. MARQUES<sup>c</sup>, Djalma N. MARQUES<sup>c</sup>, Maria Inês Sucupira MACIEL<sup>a</sup>; Luciano Avallone BUENO<sup>d</sup>

#### RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPSs) têm sido amplamente estudados nas últimas décadas devido à sua semelhança com as gomas usadas na indústria alimentícia. Eles podem ser usados como espessante e/ou estabilizantes no processamento de alimentos. Este trabalho teve como objetivo investigar o comportamento térmico e composição estrutural dos EPSs liofilizados obtidos a partir da fermentação de grãos de kefir em leite de vaca e extrato de soja. As curvas termogravimétricas dos EPSs obtidas foram similares às aquelas relatadas na literatura para outros EPSs. As temperaturas de degradação foram relativamente altas com vários eventos endo e exotérmicos, mostrando que os EPSs deste estudo apresentam alta estabilidade térmica e, conseqüentemente, poderia ser usado como um aditivo em alimentos termicamente processados. Bandas polissacarídicas características foram observadas no espectro infravermelho. Os dados dos IVs apresentaram similaridade a vários outros resultados para outros polissacarídeos presentes na literatura, apresentando bandas características de grupos funcionais de anéis glicosídicos.

Palavras-chave: Kefir; Polissacarídeos microbianos; Biopolímeros

<sup>a</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil; priorganica@gmail.com

<sup>b</sup>Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

<sup>c</sup>BioLogicus-Ind. e Com. de Produtos Naturais S.A., Recife, Brasil.

<sup>d</sup>Universidade Federal do ABC, São Paulo, Brasil.

## 1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos extracelulares, também chamados exopolissacarídeos podem ser produzido por diversos organismos vivos, dentre estes, os micro-organismos. Esses polissacarídeos encontram-se associados à superfície celular na forma de cápsulas ou são secretados para o meio extracelular em forma de muco no processo fermentativo (SUTHERLAND, 1990; SILVA et al., 2006; JUNGBUNZLAUER, 2018).

No geral, as bactérias e microalgas são as maiores produtoras de EPSs, enquanto que os fungos e leveduras produzem estes carboidratos em menores quantidades. Muitos estudos realizados nas últimas duas décadas tem mostrado otimização para os processos fermentativos, o que resulta em processos capazes de produzir quantidades de EPS satisfatórias para o uso em escala industrial como alternativa aos polímeros usados tradicionalmente (SILVA et al., 2006; JUNGBUNZLAUER, 2018).

Os processos de extração e purificação podem afetar as propriedades físico-químicas e estruturais dos polissacarídeos e, portanto, a caracterização dos polissacarídeos é essencial para determinar propriedades adequadas para o propósito de sua utilização como aditivos alimentares. Muitas vezes, a estrutura desses polímeros é modificada para aumentar suas propriedades reológicas e torná-las adequadas para várias aplicações alimentares (AHMED et al. 2013).

No geral, os EPSs alicados na indústria são a celulose, o amido, o alginato e carragena de algas e sementes e pectina de plantas e agar (SINGHA, 2012). Estes EPSs apresentam propriedades semelhantes as de biopolímeros como a dextrana, o agar, a xantana, a pululana, a gelana e os alginatos bacterianos. Tanto indústrias de cosmético como alimentícias utilizado os EPSs como aditivo em produtos como os de higiene bucal e pessoal, fibras para tratamento de frimentos e cortes cirúrgicos, alimentos, entre outros. Dentre as empresas que comercializam produtos com adição de EPSs estão Johnson&Johnson, Dencril, DANISCO® DUPONT™, LM FARMA, SCJohnson, CP Kelco, FOREVER Health Food, PHARMACOSMOS, ANIKA THERAPEUTICS, MONTANA POLYSACCHARIDES, SOLVAY e Ametech (COLENCI, 2017; DENCRIL, 2018; UNILEVER, 2018; DANISCO® DUPONT™, 2018; CPKELCO, 2018).

Desta forma, este estudo objetivou analisar o comportamento térmicos e parâmetros estruturais de importância industrial dos EPSs obtidos dos fermentados

de leite de vaca e soja por grãos de kefir obtidos das bebidas fermentadas denominadas Kefir BioLogicus® de leite e de soja.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos Exopolissacarídeos (EPSs) dos fermentados de extrato de soja e leite por grãos de kefir

Os EPSs foram obtidos a partir das bebidas fermentadas denominadas Kefir BioLogicus® de leite e de extrato de soja. Os EPSs brutos foram fornecidos em forma de goma que, posteriormente, foram redissolvidos em água e precipitados em etanol gelado por várias vezes e, em seguida, centrifugados em uma centrífuga refrigerada CIENTEC CT-6000R 115 mm (10000 g, 20 min, 20°C) para a eliminação de outros resíduos. Por fim, os EPSs foram liofilizados e armazenados a -18°C.

### 2.2 Propriedades físico-químicas dos EPSs

Após liofilização por 24h os EPSs foram submetidos à análise de Atividade de água ( $A_w$ ), determinação do pH e análise de proteínas solúveis do EPSs bruto. O teor de proteína foi verificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. A atividade da água ( $A_w$ ) do EPS liofilizado foi determinada usando um medidor AquaLab 4TEV. O pH da solução contendo o EPS a uma concentração de 10% foi lido diretamente por um medidor de pH Tecnal. O Teor de Açúcares Redutores (TAR) foi verificado através do método de Antrona (YEMM; WILLIS, 1954).

### 2.3 Análise Termogravimétrica (ATG)

As análises térmicas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nanotecnologia (LMNANO) do Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste - CETENE. Utilizou-se a análise térmica diferencial, DTA, calorimetria diferencial de varredura, DSC e análise termogravimétrica, TGA com o DTG SHIMADZU e DSC SHIMADZU. A taxa de aquecimento foi de 10°C/minuto em atmosfera de N<sub>2</sub> com fluxo de 50 mL/minuto, varrendo uma faixa de 25 a 600°C.

## 2.4. Espectroscopia de Infravermelho (IV)

As análises de espectroscopia de IV foram realizadas no Laboratório de Materiais Híbridos (LMH) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os espectros de IV foram obtidos através de um espectrômetro IR Prestige 12 SHIMADZU, utilizando a técnica de por reflectância difusa – acessório DRS-8000A (Transmitância). Os mesmos foram gravados em um intervalo de números de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  e 60 scans.

## 2.5. Análise estatística

Os dados foram analisados usando o procedimento do modelo linear geral do software OringinPro 8.0 (OriginPro 8 SR0, Copyright©1991-2007, OriginLab Corporation). Todas os experimentos tratados por este software foram replicados 3 vezes.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Propriedades físico-químicas e características estruturais dos Exopolissacarídeos (EPSs)

Os valores de atividade de água (Aa), quantidade de proteínas, pH e açúcares redutores foram reportados previamente em uma publicação anterior destes mesmos produtos.

O pH de EPSsj e EPSle apresentaram valores aproximados com pequenas variações ( $\text{pH}_{(\text{EPSsj})} = 6,02 \pm 0,05$  e  $\text{pH}_{(\text{EPSl})} = 6,0 \pm 0,05$ ). Esta baixa acidez pode ser associada a presença de algumas cadeias de aminoácidos, como a alanina já mencionada em publicação anterior.

Os valores de atividade de água (Aa) para o EPS de Soja (EPSsj) e o EPS de leite (EPSle) foram 0,21 e  $0,26 \pm 0,001$  a 25°C, respectivamente, sendo classificados por Fennema, Damodaram e Parkin (2010) na Zona A de Aw, faixa condizente com produtos que passam por liofilização. Botelho, et al. (2014) verificaram valorem

aproximados de  $A_w$  para o EPS obtido da fermentação de grãos de kefir em extrato de soja.

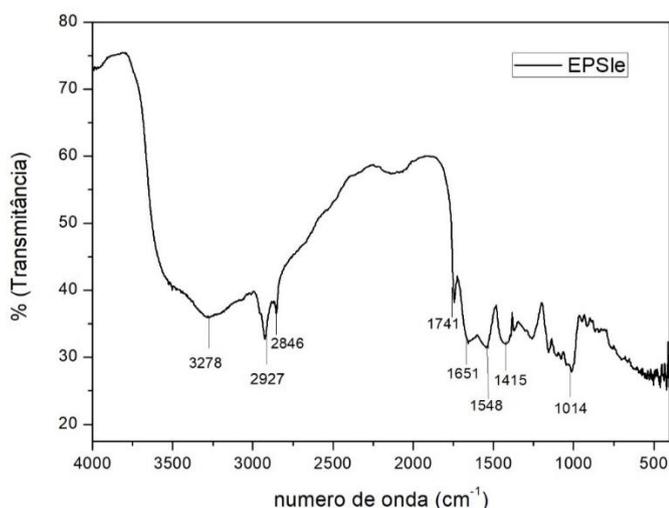
Para a análise de proteína obteve-se aproximadamente 1,5% v/v de proteínas solúveis nas amostras, com pequenas variações. Valores semelhantes de conteúdo de proteínas em EPSs obtidos da fermentação de grãos de kefir em extrato de soja foram verificados por Botelho et al. (2014), sendo 2% v/v e Liu, Chen e Lin (2002) que obtiveram 2,3% v/v. Também, usando o mesmo método, Piermaria et al. (2008) identificaram um baixo teor de proteínas para uma solução de EPS obtido por meio da fermentação de grãos de kefir em leite bovino.

Os resultados obtidos por CG e RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , anteriormente para as mesmas amostras, indicaram que o EPS<sub>sj</sub> é formado por moléculas de  $\alpha$ -glc-(1→4) e o EPS<sub>le</sub> é formado por moléculas de  $\alpha$ -glcp-(1→4)- $\alpha$ -ramp-(1→6)- $\beta$ -galp. Com massas molares de  $1,17 \times 10^4$  g/mol para o EPS<sub>sj</sub> e  $2,22 \times 10^6$  g/mol para o EPS<sub>le</sub>. (dados não mostrados).

### 3.2 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A espectroscopia IV tem sido usada para obter informações estruturais relacionadas à vibração de grupos funcionais, presentes em diferentes biopolímeros. Os espectros IV do Exopolissacarídeos (EPSs) estão representados nas Figura 1 e 2.

FIGURA 1 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO EPS<sub>le</sub>



Fonte: O AUTOR (2018).

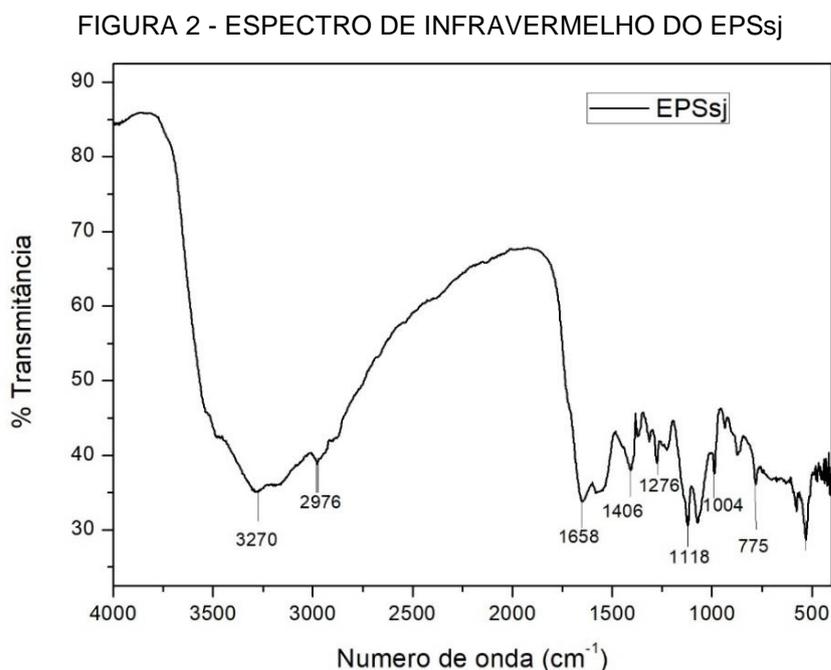
O espectro do EPSle mostrou um complexo de bandas na faixa entre 4000 e 500  $\text{cm}^{-1}$ . Pode-se observar uma banda larga no intervalo de 3020 a 3576  $\text{cm}^{-1}$ , com máximo em 3278  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a estiramentos de grupos hidroxilas (-OH). De acordo com a literatura, essa extensão é causada pela interação de grupos hidroxila livres em ligações de hidrogênio intra e intermolecular (WANG et al., 2010; GRADOVA; KHOKHLACHEVA; MURZINAA; MYASOYEDOVA, 2015; ZHANG et al., 2016). As bandas fracas em 2927  $\text{cm}^{-1}$  e 2846  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas vibrações de estiramento e deformação angular de C-H e  $-\text{CH}_2$  de grupos alifáticos, assim como de grupos metil e metileno (BRAMHACHARI et al., 2007; WANG et al., 2008a; WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2016; ZHANG et al. 2017). No interval entre 1600  $\text{cm}^{-1}$  e 1826  $\text{cm}^{-1}$ , observa-se duas bandas com máximo em 1651  $\text{cm}^{-1}$  e 1741  $\text{cm}^{-1}$ . Estes sinais são característicos de estiramento assimétrico e simétrico de ligações de C=O de  $\text{COO}^-$  que pode ser atribuído ao grupo ácido de aminoácidos (HAXAIRE et al., 2003; WANG et al., 2008a; WANG et al., 2010; CHEN et al., 2014; ZHANG et al. 2016).

O sinal em 1651  $\text{cm}^{-1}$  também pode ser atribuído a outras vibrações derivadas da hidoxila, resultado que converge com o observado por Zhang et al., (2016) quando estes analisaram um EPS obtido de um fermentado de leite desnatado por *Streptococcus thermophilus*. As bandas em 1415  $\text{cm}^{-1}$  e 1548  $\text{cm}^{-1}$  também são relacionadas a estiramentos de ligações carbonila (C=O) (ZHANG et al. 2017). A região de 1000-1200  $\text{cm}^{-1}$  apresenta bandas características de estiramentos C-O-C e C-O de grupos álcool em carboidratos. Sinais no interval entre 1000  $\text{cm}^{-1}$  e 1150  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos a estiramentos assimétricos de C-O-C de anéis de piranoses de álcool, éter e grupos fenólicos (GRADOVA; KHOKHLACHEVA; MURZINAA; MYASOYEDOVA, 2015). Além disso, sinais neste interval pode indicar que o polímero apresenta estrutura tipo- $\alpha$ . (ZHANG et al., 2016).

Sinais abaixo de 1000  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos a deformações fora do plano de anéis glicosídicos (GRADOVA; KHOKHLACHEVA; MURZINAA; MYASOYEDOVA, 2015; ZHANG et al. 2017) Sinais abaixo de 1000  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos a deformações fora do plano de anéis glicosídicos (GRADOVA; KHOKHLACHEVA; MURZINAA; MYASOYEDOVA, 2015; ZHANG et al. 2017) Bandas abaixo de 1500  $\text{cm}^{-1}$  estão na região da impressão digital. Essas bandas caracterizam a molécula de forma geral observa-se grande absorção no espectro do EPSle. Essa banda indica que a substância é um polissacarídeo de acordo com achados de Cho et al., (1998), Nataraj et al., (2008) e Zhang et al. (2017).

O espectro de IV do EPSsj apresentou um perfil semelhante ao do EPSle (Figura 2). Pode-se observar uma banda larga característica de estiramentos de grupos hidroxilas (-OH) que vai do intervalo de 3024 a 3778  $\text{cm}^{-1}$  (WANG et al., 2010; GRADOVA; KHOKHLACHEVA; MURZINAA; MYASOYEDOVA, 2015; ZHANG et al., 2016). A banda em 2976  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída às vibrações de estiramento e deformação angular de C-H e  $-\text{CH}_2$  de grupos alifáticos, assim como de grupos metil e metileno (BRAMHACHARI et al., 2007; WANG et al., 2008a; WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2016; ZHANG et al. 2017). A banda em 1628  $\text{cm}^{-1}$  é característica de estiramentos assimétrico e simétrico de ligações de C=O de  $\text{COO}^-$  que pode ser atribuído ao grupo ácido de aminoácidos (HAXAIRE et al., 2003; WANG et al., 2008a; WANG et al., 2010; CHEN et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

A banda em 1406  $\text{cm}^{-1}$  também está relacionada a estiramentos de ligações carbonila (C=O) (ZHANG et al., 2017). Para as bandas em 1276 e 1118  $\text{cm}^{-1}$  pode-se atribuir estiramentos que indicam a presença de ligações C-O de polissacarídeos (ZHANG et al. 2017). Os sinais abaixo de 1000  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos a deformações fora do plano de anéis glicosídicos, característicos de glicosídeos. Resultados semelhantes foram reportados por Gradova, Khokhlacheva, Murzinaa e Myasoyedova (2015) e Zhang et al., (2017).

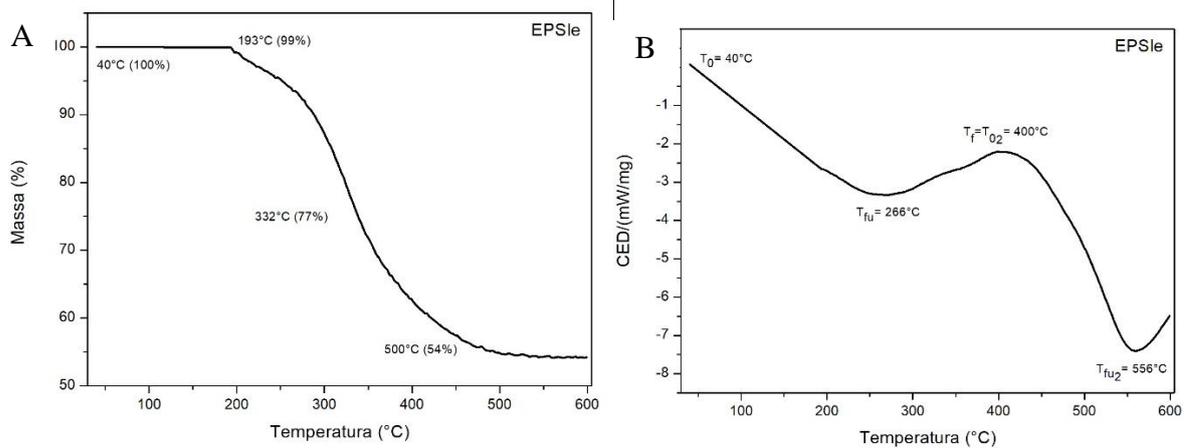


Fonte: O AUTOR (2018).

### 3.3 Análise Termogravimétrica (ATG)

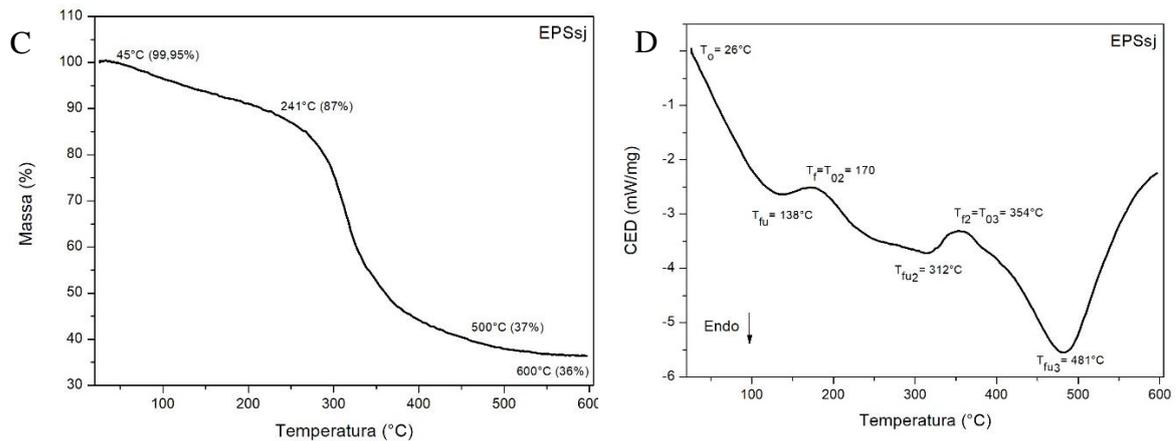
A Análise Termogravimétrica (TGA) do EPS foi realizada de forma dinâmica (perda de peso em função da temperatura), a curva com os resultados experimentais é mostrada na figura 3 e 4.

FIGURA 3 – ESPECTROS TERMOGRAVIMÉTRICO DE PERDA DE MASSA DO EPSle (A) E TERMOGRAVIMÉTRICO DIFERENCIAL DE PERDA DE MASSA (B)



Fonte: O AUTOR (2018).

FIGURA 4 – ESPECTROS TERMOGRAVIMÉTRICO DE PERDA DE MASSA DO EPSsj (C) E TERMOGRAVIMÉTRICO DIFERENCIAL DE PERDA DE MASSA (D)



Fonte: O AUTOR (2018).

Encontra-se na literatura estudos referentes à degradação térmica de carboidratos. Os resultados revelaram que algumas substâncias comuns, tanto voláteis como não voláteis, foram formadas para tipos de carboidratos diferentes. De acordo com Fagerson (1969) durante o aumento de temperatura existem ocorrências

primárias que são a gelatinização e o inchaço, após estas duas ocorrências, surgem outros eventos superiores à medida que se aumenta a faixa temperatura-tempo. Estes eventos são desidratação, pirólise e ressíntese. Durante estes três últimos eventos produtos voláteis e não voláteis são gerados pela quebra das ligações de polissacarídeos e formação de novas ligações.

Na curva TGA do EPS<sub>le</sub> pode-se observar três eventos durante o aumento da faixa temperatura-tempo (Figura 3). O primeiro evento ocorreu entre 40 e 193°C, sendo a temperatura inicial do evento ( $t_0$ )= 40°C e mas só em 193°C houve perda significativa de massa. Pode-se observar que este primeiro evento é endotérmico, apresentando de perda de massa (1% aproximadamente) em 193°C. Na curva TGA do EPS<sub>sj</sub> pode-se observar seis eventos durante o aumento da faixa temperatura-tempo (Figura 4). O primeiro evento ocorreu entre 25 e 45°C, com  $t_0$ =26°C, ocorrendo perda de menos de 1% da massa inicial. Dessa forma, apenas partir de 45°C houve perda de massa significativa. Este primeiro evento de perda de massa pode estar associado à perda de umidade (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005; PARIKH; MADAMWAR, 2006; WANG et al., 2010). O teor de umidade da amostra é um indicativo da presença de grupos carboxílicos na estrutura. Há relação direta entre a quantidade de grupos carboxílicos presentes na estrutura do polissacarídeo e a afinidade deste com a água (PARIKH; MADAMWAR, 2006; ZHANG et al., 2016).

O segundo evento para o EPS<sub>le</sub> ocorreu entre 193 e 266°C. A temperature de fusão deste evento ( $t_{fu}$ ) foi 266°C. Este segundo evento mostra absorção de energia que é representada por uma curva endotérmica com um máximo em 266°C. Neste evento houve apenas 3% de perda da massa inicial do EPS, mostrando uma boa estabilidade térmica do EPS. O terceiro evento ocorreu entre 266 e 400°C. Este evento apresentou uma curva exotérmica com temperature final ( $t_f$ ) de 400°C. Neste evento pode-se observar perda de massa de aproximadamente 40% da massa inicial. Isto pode estar associado a quebras das cadeias polissacarídicas gerando compostos de cadeias menores, portanto, voláteis. Após isso pode-se observar um terceiro evento endotérmicos com  $t_{02}$ =400°C e  $t_{fu2}$ =556°C. Neste evento ocorreu perda de massa de 56% da massa inicial de EPS<sub>le</sub>. Após  $t_{fu2}$  houve perda de energia até a temperature final da análise.

Para o EPS<sub>sj</sub> o segundo evento ocorreu entre 45 e 138°C, sendo  $t_0$ =45°C e  $t_{fu}$ = 138°C. Este evento apresentou uma curva endotérmica com perda de massa de aproximadamente 7% da massa inicial da amostra. Entre 138°C e 170°C pode-se

observar liberação de energia. Isso pode ser atribuído a quebras iniciais de ligações na cadeia polimérica do EPSsj, no final deste evento a amostra manteve 92% da sua massa inicial, apresentando, assim, boa estabilidade a tratamentos térmicos.

Em  $t_{02}=170^{\circ}\text{C}$  inicia-se um evento endotérmico com  $t_{fu2}= 312^{\circ}\text{C}$ . Este evento apresenta curva endotérmica com perda de massa de 31%. Em seguida a curva cresce, mostrando que está ocorrendo reações exotérmicas com  $t_{f2}=354^{\circ}\text{C}$ . Por fim, pode-se observar o ultimo evento, com curva endotérmica, iniciando em  $354^{\circ}\text{C}$  e com  $t_{fu3}$  de  $481^{\circ}\text{C}$ . Neste evento a amostra perdeu cerca de 62% de sua massa inicial. A partir de  $481^{\circ}\text{C}$  o EPSsj começa a absorver energia até a temperatura final da análise. Na temperatura final resta, ainda, 36% da massa inicial de EPSsj.

Estes resultados podem ser comparados às temperaturas de degradação ( $T_d=t_{fu}$ ) e às curvas (ATG) observadas por Parikh e Madamwar (2006) para os EPSs cianobacteriais da *Oscillatoria* sp. e da *Nostoc* sp. e para a goma Guar. Os valores dos eventos de maior perda de massa foram  $350\text{-}490^{\circ}\text{C}$  (*Oscillatoria* sp.),  $340\text{-}530^{\circ}\text{C}$  (*Nostoc* sp.) e  $340\text{-}550^{\circ}\text{C}$  (goma Guar). Ainda em comparação aos resultados apresentados por Wang et al., (2010), Ahmed et al., (2013), Botelho et al., (2014) e Zhang et al., (2016), pode-se observar que a  $T_d$  do EPS em estudo foi um pouco maior que a  $T_d$  dos EPSs analisados por esses autores, diferindo em aproximadamente, no máximo,  $50^{\circ}\text{C}$ , porém, o perfil de curva TGA foi o mesmo. Esta diferença entre as  $T_d$  pode ser explicada pela diferente composição estrutural dos EPSs. As características térmicas dos polissacarídeos como absorção e emissão de energia são acompanhadas por mudanças físicas como deformações estruturais ou fusão do polissacarídeo cristalino (WANG et al., 2008a).

Devido a similaridade das propriedades térmicas dos EPSs em estudo em relação a EPSs já estudados anteriormente, pode-se afirmar que este possui boa estabilidade térmica para possíveis aplicações na indústria, já que as temperaturas de processamento atingem a faixa de  $150^{\circ}\text{C}$  (AHMED et al., 2013). As semelhanças entre os EPS apresentados podem ser associadas à composição monossacarídica, assim como a forma que os monômeros se encontram ligados.

#### 4 CONCLUSÃO

Análises mostraram que o EPSsj em sua maioria é composto de moléculas de glicose e em sua minoria de moléculas de manose e galactose formado por unidades

de  $\alpha$ -Glc<sub>p</sub> ligadas-(1,6) e o EPS<sub>le</sub> é constituído de moléculas de glicose e galactose na formação  $\beta$ -gal<sub>p</sub>-O-glc<sub>p</sub>-(1-4).

Os dois EPSs, apresentaram comportamentos térmicos semelhante aos de outros polissacarídeos durante a faixa temperatura-tempo observada, com boa estabilidade térmica, sendo resistente a degradação a faixas de temperaturas relativamente altas. Estes resultados comprovam que o EPS<sub>le</sub> e o EPS<sub>sj</sub> podem ser usados, sem alterações estruturais, no processamento de alimentos que também recebam tratamentos térmicos.

## REFERÊNCIAS

AHMED, Z.; WANG, Y.; ANJUM, N.; AHMAD, 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.

BRAMHACHARI, P.V.; KAVI KISHOR, P.B.; RAMADEVI, R.; KUMAR, R.; RAO, B.R.; DUBEY, S.K. Isolation and Characterization of Mucous Exopolysaccharide (EPS) Produced by *Vibrio furnissii* Strain VB0S3. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.14–51, 2007.

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

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CHEN, X.; DING, Z-Y.; WANG, W-Q.; SIU, K-C.; WU, J-Y. An antioxidative galactomannan–protein complex isolated from fermentation broth of a medicinal fungus Cs-HK1. **Carbohydrate Polymers**, v.112, p. 469–474, 2014.

CHO, J.; AMY, G.; PELLEGRINO, J.; YOON, Y. Characterization of clean and natural organic matter (NOM) fouled NF and UF membranes, and foulants characterization. **Desalination**, v.118, p.101-108, 1998.

COLENCI, R. Biomembrana de celulose *versus* curativo com collagenase no tratamento de úlceras venosas crônicas: ensaio clínico randomizado, aberto e controlado. **Tese de doutorado**. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP, 2017.

CPKELCO. **CPKelco A HUBER COMPANY**, 2018. Disponível em: <https://www.cpkelco.com>. Acesso em: 10/10/2018.

DANISCO® DUPONT™. **DUPONT NUTRITION & HEALTH**, 2018. Disponível em: <http://www.danisco.com/food-beverages/>. Acesso em: 10/10/2018.

DENCRIL. **ALGINATO DENCRISEL®**, 2018. Disponível em: <http://www.dencril.com.br/portal/>. Acesso em: 10/10/2018.

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

GRADOVA, N. B.; KHOKHLACHEVA, A. A.; MURZINAA, E. D.; MYASOYEDOVA, V. V. Microbial Components of Kefir Grains as Exopolysaccharide Kefiran Producers. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.51, n.9, p.873–880, 2015.

HAXAIRE, K.; MARÉCHAL, Y.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Hydration of Polysaccharide Hyaluronan Observed by IR Spectrometry. I. Preliminary Experiments and Band Assignments, **Biopolymers (Biospectroscopy)**, v.72, p.10–20, 2003.

JUNGBUNZLAUER, 2018. Disponível em: <<http://www.jungbunzlauer.com/products-applications/applications.html>> Acesso em: 06/07/2018.

LIU, J. R.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. **Journal of food science**, v.67 n.1, p.104 – 108, 2002.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (*Gracilariales, Rhodophyta*). **Bioresource Technology**, v.96, p.379-382, 2005.

NATARAJ, S.; SCHOMACKER, R.; KRAUME, M.; MISHRA, M. I.; DREWS, A. Analyses of polysaccharide fouling mechanisms during crossflow membrane filtration. **Journal of the Membrane Science**, v.308, p.152–161, 2008.

PARIKH, A.; MADAMWAR, D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v.97, p.1822–1827, 2006.

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

SINGHA, T.K. Microbial extracellular polymeric substances: Production, isolation and applications. **IOSR Journal of Pharmacy**, v.2, n.2, p.276–281, 2012.

SILVA, M. L. C; MARTINEZ, P.F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE GLUCANAS FÚNGICAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. **Química Nova**, v.29, n.1, p.85-92, 2006.

SUTHERLAND, I. W. Biotechnology of Microbial Polysaccharides. Cambridge Studies. **Biotechnology 9**. Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1990.

UNILEVER. **Sorvete KIBON® Sorveteria Tentação**, 2018.

Disponível em: <https://www.kibon.com.br/nossas-marcas/sorveteria/sorveteria-tenta%C3%A7%C3%A3o.html>. Acesso em: 10/10/2018.

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

WANG, Y; LI, C.; LIU, P.; AHMED, Z.; XIAO, P.; BAI, X. Physical Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 Isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p.895–903, 2010.

YEMM, E. W.; WILLIS, B. F. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, p.3, 1954.

ZHANG, J.; CAO, Y.; WANG, J.; GUO, X.; ZHENG, Y.; ZHAO, W.; MEI, X.; GUO, T.; YANG, Z. Physicochemical characteristics and bioactivities of the exopolysaccharide and its sulphated polymer form *Streptococcus thermophilus* GST-6. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 368-375, 2016.

ZHANG, H.; WANG, X.; LI, R.; SUN, X.; SUN, S.; LI, Q.; XU, C. Preparation and Bioactivity of Exopolysaccharide from an Endophytic Fungus *Chaetomium* sp. Of the

Medicinal Plant *Gynostemma Pentaphylla*. *Pharmacognosy Magazine*, v. 13, n. 51, p. 477-482, 2017.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo verificaram-se algumas características físico-químicas dos Exopolissacarídeos (EPSs) obtidos dos fermentados dos grãos de kefir em extrato de soja e leite de vaca, assim como também foi verificada a composição estrutural destes EPSs.

Observou-se com os resultados obtidos que os produtos extraído do fermentado são EPSs devido as suas propriedades similares a de outros EPSs encontrados na literatura como: o baixo resultado para o teor de açúcares redutores revelando a característica um polissacarídeo; o pH e o teor de proteínas obtidos mostra que ao se obter os EPSs vários compostos presentes no meio são eliminados, resultando em uma solução viscosa composta de quase que exclusivamente do polímero.

Os resultados obtidos por IV corroboraram para a identificação relacionada à natureza dos EPSs. Os espectros de infravermelho apresentaram similaridade a vários outros resultados referentes a outros polissacarídeos presentes na literatura.

A determinação de massas molares foi realizada por Cromatografia de Exclusão por Tamanho de Alta Eficiência acoplado a um detector de Espalhamento de Lasers Multiângulos e um detector de Índice de Refração (CETAE-ELM-IR) e revelou para o EPS obtido do fermentado em extrato de soja grande heterogeneidade sendo a maior fração com massa molar  $1,17 \times 10^4$  g/mol. O EPS obtido do fermentado em leite de vaca também apresentou grande heterogeneidade e em sua maior fração obteve-se massa molar  $2,22 \times 10^6$  g/mol.

A identificação da composição monossacarídica dos produtos realizada por de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massas (CG-EM), mostrou que o EPS obtido do fermentado em extrato de soja é constituído em sua maioria é composto de moléculas de glicose e o EPS obtido do fermentado em leite de vaca apresentou em sua constituição de moléculas de glicose, ramnose e galactose. Os valores quantitativos do EPSle não foram compatíveis com a quantificação realizada no RMN da mesma amostra, embora tenham sido identificados os mesmos monômeros.

O RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indicou que o EPS obtido do fermentado em extrato de soja é formado por unidades de  $\alpha\text{-Glc}_p$  ligadas-(1,4) e o EPS obtido do fermentado em leite de vaca é formado por unidades de  $\alpha\text{-glc}_p$ -(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha\text{-ramp}$ -(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta\text{-gal}_p$ .

As ATGs mostraram para os dois EPSs comportamentos semelhante ao de outros polissacarídeos durante a faixa temperatura-tempo observada. Os dois EPSs apresentaram boa estabilidade térmica, sendo resistente a degradação a faixas de temperaturas relativamente altas. Estes resultados comprovam que o EPS<sub>le</sub> e o EPS<sub>sj</sub> podem ser usados, sem alterações estruturais, no processamento de alimentos que também recebam tratamentos térmicos.

## REFERÊNCIAS

ABDELALI, H.; CASSAND, P.; SOUSSOTTE, V. Antimutagenicity of component of dairy products. **Mutation Research**, n. 331, p. 133 – 141, 1995.

ABIA – Associação Brasileira de Indústria de Alimentação. **Desafios e superações da indústria da alimentação**. Relatório Anual 2012, 2012.  
Disponível em: <[https://www.abia.org.br/vsn/anexos/relatorio\\_anual\\_abia\\_2012.pdf](https://www.abia.org.br/vsn/anexos/relatorio_anual_abia_2012.pdf)>  
Acesso em: 02/10/2018.

ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. **Journal of Dairy Research**, v.66, p.327-333, 1999.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Liquid Chromatography**, 2018. Disponível em <[www.agilent.com](http://www.agilent.com)>. Acesso em: 15/06/2018.

AI, L.; GUO, Q.; DING, H.; GUO, B.; CHEN, W.; CUI, S. W. Structure characterization of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W from skim milk. **Food Hydrocolloids**, v.56, p.134-143, 2016.

ALMEIDA, S.; CRESPI, M.; LIMA, E. N.; SCHALCH, V. Determinação por termogravimetria (tg) da matéria orgânica presente em atmosfera de resíduo sólido urbano de aterro sanitário: O caso de São Carlos. **HOLOS Environment**, v.8, n.1, p.88, 2008.

AMETECH. **SUSPENSION CONCENTRATES (SC)**, 2018. Disponível em: <http://www.ametech.it/sc-suspension-concentrates-product-list>. Acesso em: 02/10/2018.

ANIKA THERAPEUTICS. **Anika Therapeutics, Inc**, 2018. Disponível em: <https://www.anikatherapeutics.com/>. Acesso em: 10/10/2018.

ANTONUCCI, J.M.; TOTH, E.E. Extent of polymerization of dental resins by differential scanning calorimetry. **Journal of Dental Research**, v.62, n.2, p.121-125, 1983.

BAE, S. O.; SUGANO, Y.; OHI, K.; SHODA, M. Features of bacterial cellulose synthesis in a mutant generated by disruption of the diguanylate cyclase 1 gene of *Acetobacter xylinum* BPR 2001. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v.65, p.315–322, 2004.

BIOLOGICUS. **Informativo científico**, 2017. Disponível em: < <https://blog.biologicus.com.br/informativo-cientifico.pdf> > Acesso em: 20/10/2018.

BLANDÓN, L. M.; ISLAN, G. A.; CASTRO, G. R.; NOSEDA, M. D.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. Kefiran-alginate gel microspheres for oral delivery of ciprofloxacin, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.145, p.706–715, 2016.

BRASIL FOOD TRENDS 2020. **Consumo, tendências e inovações**. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo e Instituto de Tecnologia de Alimentos, SP, 2010. Disponível em: < <http://www.alimentosprocessados.com.br/arquivos/Consumo-tendencias-e-inovacoes/Brasil-Food-Trends-2020.pdf> > Acesso em: 01/11/2018.

BONATO, P. S. **Cromatografia gasosa**. In: Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997, p.141-181.

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

BUBB, W.A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v.19A, n.1, p.1-19, 2003.

BUBB, W. A. NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity. **Carbohydrate NMR Primer**, p.1-19, 2006.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª ed. Revista de Campinas: Editora da Unicamp, p.207, 2003.

CHAKRABORTY, T.; SARKAR, S.; SEM, A. K.; PAL, R. Extracellular Polysaccharides of the cyanobacterium- *Leptolyngbya tenuis*: Structural characterization and its compositional changes during stress exposure. **International Journal of Advanced Research**, v.3, n.11 , p.15 – 39, 2015.

CHANDA, S. K.; JONES, K. N.; PERCIVAL, E.G.V. The Constitution of Xylan from Esparto Grass (*Stipa tenacissima* L.). **Journal of the Chemical Society**, p.1289, 1950.

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v.47, n.2, p.107–124, 2009.

CHEN, T.-H.; LWANG, S.-Y.; CHEN, K.-N.; LIU, J.-R.; CHEN, M.-J. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.3002 - 3013, 2009.

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

CHEN, Z.; SHI, J.; YANG, X.; LIU, Y.; NAN, B.; WANG, Z. Isolation of exopolysaccharide-producing bacteria and yeasts from Tibetan kefir and characterisation of the exopolysaccharides. **International Journal of Dairy Technology**, v.69, p.3, 2016.

CHIEN, H. L.; HUANG, H. Y.; CHOU, C. C. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v.23, n.8, p.772 - 778, 2006.

CHO, J.; AMY, G.; PELLEGRINO, J.; YOON, Y. Characterization of clean and natural organic matter (NOM) fouled NF and UF membranes, and foulants characterization. **Desalination**, v.118, p.101-108, 1998.

COLENCI, R. Biomembrana de celulose *versus* curativo com colagenase no tratamento de úlceras venosas crônicas: ensaio clínico randomizado, aberto e

controlado. **Tese de doutorado**. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP, 2017.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. Em: **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997, p.11-27.

CPKELCO. **CPKelco A HUBER COMPANY**, 2018. Disponível em: <https://www.cpkelco.com>. Acesso em: 10/10/2018.

CREMONINI, F.; Di CARO, S.; COVINO, M. Effect of different probiotic preparations on anti *Helicobacter pylori* therapy related side effects: a parallel group, triple blind, placebo controlled study. **American Journal of Gastroenterology**, v.97, p.2744 – 2749, 2002.

CUI, F.; GAO, X.; ZHANG, J.; LIU, M.; ZHANG, C.; XU, N.; ZHAO, H.; LIN, L.; ZHOU, M.; JIA, L. Protective Effects of Extracellular and Intracellular Polysaccharides on Hepatotoxicity by *Hericium erinaceus* SG-02. **Current Microbiology**, v.73, p.379–385, 2016.

DENCRIL. **ALGINATO DENCRIGEL®**, 2018. Disponível em: <http://www.dencril.com.br/portal/>. Acesso em: 10/10/2018.

DADKHAH, S.; POURAHMAD, R.; ASSADI, M. M.; MOGHIMI, A Kefir production from soymilk. **Annals of Biological Research**, v.2, n.6, p.293-299, 2011.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Atualidades em Química**, v.7, p.21-25, 1998.

DANISCO® DUPONT™. **DUPONT NUTRITION & HEALTH**, 2018. Disponível em: <http://www.danisco.com/food-beverages/>. Acesso em: 10/10/2018.

DERTLI, E.; COLQUHOUN, I. J.; GUNNING, A. P.; BONGAERTS, R. J.; GALL, G. L.; BONEV, B. B. MAYER, M. J.; NARBAD, A. Structure and Biosynthesis of Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, n.44, p.31938–31951, 2013.

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

DI, W.; ZHANG, L.; WANG, S.; YI, H.; HAN, X.; FAN, R.; ZHANG, Y. Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. **Carbohydrate Polymers**, v.171, p.307–315, 2017.

DIMOPOULOU, M.; VUILLEMIN, M.; CAMPBELL-SILLS, H.; LUCAS, P. M.; BALLESTRA, P.; MIOT-SERTIER, C.; FAVIER, M.; COULON, J.; MOINE, V.; DUBOC, P.; MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides. **International Dairy Journal**, v.11, p.759-768, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350 – 356, 1956.

DUUS, J.; GOTFREDSEN, C. H.; BOCK, K. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Mod-ern methods and limitations. **Chemical Reviews**, 100:4589 – 4614, 2000.

ELSAYED, E.A.; FAROOQ, M.; DAILIN, D.; EL-ENSHASY, H. A.; OTHMAN, N. Z.; MALEK, R.; DANIAL, E.; WADAAN, M. In vitro and in vivo biological screening of kefiran polysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens*. **Biomedical Research**, 28, 2, 2017.

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

EXARHOPOULOS, S.; RAPHAELIDES, S. N.; KONTOMINAS, M. G. Flow behavior studies of kefiran systems, **Food Hydrocolloids**, v.79, p.282-290, 2018.

FABER, E. J.; VAN DEN HAAK, M. J.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F.G. Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3, **Carbohydrate Research**, v.331, p.173 – 182, 2001.

FAGERSON, I. S. Thermal degradation of carbohydrates: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.17, n.4, p.747–750 1969.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. **Kefir - A Fermented Milk Product**. Handbook of Fermented Functional Foods, Second Edition, 2008.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. **Kefir: A Fermented Milk Product**. Handbook of fermented functional foods, 2003.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERREIRA, C. L. L. F. Quefir Como Alimento Funcional. In: **Alimentos Funcionais – Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio Ltda, 2010.

FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; GOMES, A.M.P.; FERREIRA, M.A. Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. **Carbohydrate Polymers**, v.37, p.225–229, 1998.

FOREVER HEALTH FOOD CO,LTD. **Konjac Vegan Sea Foods**, 2009. Disponível em: [http://www.foreverhealth.com.tw/eng/product-list.asp?kind\\_id=683](http://www.foreverhealth.com.tw/eng/product-list.asp?kind_id=683). Acesso em: 10/10/2018.

FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BRESHKOVA, D. M.; SIMIV, Z. I. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. **Z. Naturforsch**, v.57, p.805-810, 2002.

GANESHAPILLAI, J.; VINOGRADOV, E.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S.; MONTEIRO, A. Clostridium difficile cell-surface polysaccharides composed of pentaglycosyl and hexaglycosyl phosphate repeating units. **Carbohydrate Research**, v.343, p.703 – 710, 2008.

GHASEMLOU, M.; KHODAIYAN, F.; OROMIEHIE, A.; YARMAND, M. S. Characterization of edible emulsified films with low affinity to water based on kefir and oleic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.49, p.378–384, 2011.

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

GHALY, A. E.; ARAB F.; MAHMOUD N. S.; HIGGINS, J. Production of Levan by *Bacillus licheniformis* for Use as a Soil Sealant in Earthen Manure Storage Structures. **American Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v.3, n.2, p.47-54, 2007.

GORIN, P. A. J. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. New York. R. L. Whistler and J. N. BeMiller (eds). Academic Press, v.38, p.12-104, 1981.

GORSKI, D. Kefir: 21st. Century Yogurt?. **Dairy Foods**, v.95, p.49 - 50, 1994.

GRADOVA, N. B.; KHOKHLACHEVA, A. A.; MURZINA, E. D.; MYASOYEDOVA, V. V. Microbial Components of Kefir Grains as Exopolysaccharide Kefiran Producers. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.51, n.9, p.873–880, 2015.

GRIFFITTS, J.S.; HASLAM, S.M.; YANG, T.; GARCZYNSKI, S.F.; MULLOY, B. MORRIS, H. CREMER, P.S. DELL, A.; ADANG, M.J. AROIAN, R.V. Glycolipids as Receptors for *Bacillus Thuringiensis* Crystal Toxin. **Science**. v.307, p.922 – 925, 2005.

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. **In: Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997, p.183-238.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005, p.876.

HE, L.; WU, X.; CHENG, J.; LI, H.; LU, X. Purification, Composition Analysis, and Antioxidant Activity of Exopolysaccharides from Mycelial Culture of *Paecilomyces cicadae* (Miq.) Samson (Ascomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.12, n.1, p.51–62, 2010.

HEE, K.; CHOI, H-S., KIM, J. E.; HAN, N. S. Exopolysaccharide-Overproducing *Lactobacillus paracasei* KB28 Induces Cytokines in Mouse Peritoneal Macrophages via Modulation of NF- $\kappa$ B and MAPKs. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, n.11, p.1174–1178, 2011.

HSIEH, H. H. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p.73-81, 2012.

HU, T.; JIANG, C.; HUANG, Q.; SUN, F. A comb-like branched -d-glucan produced by a *Cordyceps sinensis* fungus and its protective effect against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. **Carbohydrate Polymers**, v.142, p.259–267, 2016.

IBARBURU, I.; SORIA-DIAZ, M.E.; RODRIGUEZ-CARVAJAL, M.A.; VELASCO, S.E.; TEJERO-MATEO, P.; GIL-SERRANO, A.M.; IRASTORZA, A.; DUEN, M.T. Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. **Journal of Applied Microbiology** v.103, p.477–486, 2007.

IRIGOYEN, A., ARANA, I., CASTEILLA, M., TORRE, P.; IBANEZ, F.C. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v.90, p.613-620, 2005.

IMESON, A. **Food Stabilisers Thickeners and Gelling Agents**. WILEY-BLACKWELL, 2010.

ISPIRLI, H.; DERTLI, E. Isolation and identification of exopolysaccharide producer lactic acid bacteria from Turkish yogurt. **Journal of Food Processing and Preservation**.v. 42, p.1-8, 2018.

JAIN, R. M.; MODY, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. **Carbohydrate Polymers** v.87, p.2320–2326, 2012.

JENAB, A.; ROGHANIAN, R.; EMTIAZI, G. Structure of horseshoe type microcrystal fiber of Deproteinized kefiran detected by FTIR, X-RD and AFM with antibacterial properties, **International Journal of Current Research**, v.7, n.7, p.18068-18075, 2015.

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

JING, X.; MAO, D.; GENG, L.; XU, C. Medium optimization, molecular characterization, and bioactivity of exopolysaccharides from *Pleurotus eryngii*. **Archives Microbiology**, v.195, p.749–757, 2013.

JOHNSON&JOHNSON. **Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda**, 2015. Disponível em: <https://www.roc.com.br/>. Acesso em: 10/10/2018.

JOHNSON&JOHNSON. Johnson&Johnson Wound Management Introduces Next in Line of Antimicrobial Products. **SILVERCEL® Antimicrobial Alginate Dressing Protects the Healing Environment With Silver**, 2004. Disponível em: <http://www.investor.jnj.com/releasedetail.cfm?releaseid=132736>. Acesso em: 10/10/2018.

JOHNSON&JOHNSON. **RoC®Johnson & Johnson Consumer Inc**, 2016. Disponível em: <https://www.rocskincare.com/night-creams/retinol-correxion-deep-wrinkle-night-cream#ingredients>. Acesso em: 10/10/2018.

JUNGBUNZLAUER, 2012. Disponível em: <<http://www.jungbunzlauer.com/products-applications/applications.html>> Acesso em 01/07/2018.

KACURAKOVA, M.; WILSON, R. H. Developments in mid-infrared FTIR spectroscopy of selected carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**, v.44, p.291–30, 2001.

KANVAS, G. KEFIRS MANUFACTURED FROM CAMEL (CAMELUS DRAMEDARIUS) MILK AND COW MILK: COMPARISON OF SOME CHEMICAL AND MICROBIAL PROPERTIES. **Italian Journal of Food Science**, v.27, 2015.

KESENKAŞ, H.; DĐNKÇĐ, N.; SEÇKĐN, K.; KINIK, O; GĐNÇ, S.; ERGĐNĐL, P. G.; KAVAS, G. Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of Soymilk Kefir. **African Journal of Microbiology Research**, v.5,n.22, p.3737-3746, 2011.

KHAN, T.; PARK, J. K.; KWON, J. H. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.24, n.5, p.816-826, 2007.

KNEIFEL, W.; MAYER, H. K. Vitamin profiles of kefir made from milks of different species. **International Journal of Food Science & Technology**, v.26, n.4, p.423–428, 1991.

KOBAYASHI, T.; TAKIGUCHI, Y.; YAZAWA, Y.; NAKATA, K.; YAMAGUCHI, T.; KURANE, R. Structural Analysis of an Extracellular Polysaccharide Biofloculant of *Klebsiella pneumonia*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.66, n.7, p.1524–1530, 2002.

KOOIMAN, P. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. **Carbohydrate Research**, v.7, p.220-221, 1968.

KOOIMAN, P.; ROELOFSEN, P. A.; SWEERIS, S. **Enzymologia**, v.16, p.237, 1953.

KOROLEVA, N. S. Technology of kefir and kumys. **Bulletin International Dairy Federation**, v.227, p.96, 1988.

KRCMAR, P.; NOVOTNY, C.; MARAIS, M-F.; JOSELEAU, J-P. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.24, p.6–64, 1999.

KWON, H.; KIM, J. Determination of Monosaccharides in Glicoproteins by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.215, p.243-252, 1993.

LA RIVIERE, J. W. M.; KOOIMAN, P.; SCHMIDT, K. kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. **Archives fur Mikrobiologie**, v.59, p.269-278, 1967.

LM FARMA. **CURATEC® Curativos não aderentes que estimulam a cicatrização**, 2002. Disponível em <https://loja.curatec.com.br>. Acesso em: 10/10/2018.

LAMOTHE, G. T.; JOLLY, L.; STINGELE, B. M. F. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Archives of Microbiology**, v.178, p.218-228, 2002.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna – HPLC| CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, p.254, 1993.

LeBLANC, A. M.; MATAR, C.; FARNWORTH, E.; PERDIGON, G. Study of immune cells involved in the antitumor effect of Kefir in a murine breast cancer model. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.4, p.1920 – 1928, 2007.

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Microbiological, technological and therapeutic properties of

Kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.2, p.341 – 349, 2013.

LI, P.; LIU, Z.; XU, R. Chemical characterisation of the released polysaccharide from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica* GR02. **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.71–77, 2001.

LI, W.; XIA, X.; TANG, W.; JI, J.; RUI, X.; CHEN, X.; JIANG, M.; ZHOU, J.; ZHANG, Q.; DONG, M. Structural Characterization and Anticancer Activity of Cell-Bound Exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p.3454–3463, 2018.

LIMA, L. F. O.; HABU, S.; GERN, J. C.; NASCIMENTO, B. M.; PARADA, J. L.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; NISHA, V. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Production and Characterization of the Exopolysaccharides Produced by *Agaricus brasiliensis* in Submerged Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.151, p.283–294, 2008.

LIU, J. R.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. **Journal of food science**, v.67, n.1, p.104 – 108, 2002.

LIU, J. R.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk–Kefir and Soymilk –Kefir. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2467–2474, 2005.

LIU, J. R.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J.; YUEH, P. U.; LIN, C. W. The anti-allergenic properties of milk Kefir and soymilk Kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p. 2527 – 2633, 2006.

LIU, C.; LI, X.; LI, Y.; FENG, Y.; ZHOU, S.; WANG, F. . Structural characterisation and antimutagenic activity of a novel polysaccharide isolated from *Sepiella maindroniink*. **Food Chemistry**, v.110, p.807–813, 2008.

LO, T. C. T.; KANG, M. W.; WANG, B. C.; CHANG, C. A. Glycosyl linkage characteristics and classifications of exo-polysaccharides of some regionally different strains of *Lentinula edodes* by amplified fragment length polymorphism assay and cluster analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.592, p.146–153, 2007.

LUNDQVIST, L. Structural and Interaction Studies of Polysaccharides by NMR Spectroscopy. **Doctoral Thesis**. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2015.

MA, Z.; CUI, F.; GAO, X.; ZHANG, J.; ZHENG, L.; JIA, L. Purification, characterization, antioxidant activity and antiaging of exopolysaccharides by *Flammulina velutipes* SF-06. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.107, p.73–82, 2015.

MAALEJ, H.; BOISSET, C.; HMIDET, N.; BUON, L.; HEYRAUD, A.; NASRI, M. Purification and structural data of a highly substituted exopolysaccharide from *Pseudomonas stutzeri* AS22. **Carbohydrate Polymers**, v.112, p.404–411, 2014.

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

MAEDA, H.; MIZUMOTO, H.; SUZUKI, S.; SUZUKI, K.; KITAMURA, S.M. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) from *Lactobacillus kefiranofaciens* on blood glucose in KKAY mice and constipation in SD rats induced by low-fiber diet. **Bioscience Microflora**, v.23, n.4, p.149-153, 2005.

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.

MAO, D-B.; SHI, C-W.; WU, J-Y.; XU, C-P. Optimization of exopolysaccharide production in submerged culture of *Daedalea dickinsii* and its antioxidant activity. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.37, p.1401–1409, 2014.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*). **Bioresource Technology**, v.96, p.379-382, 2005.

MCINTOSH, M.; STONE, B. A.; STANISICH, V. A. Curdlan and other bacterial (1→3)- $\beta$ -D-glucans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.163–173, 2005

MEDEIROS, J. A.; PEREIRA, M. I. The use of probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.47, n. 1, p. 1-5 (Editorial), 2013.

MICHELI, L.; UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; CRESCENZI, V., Isolation and characterization of a rosy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.69–74, 1999.

MORILLO, J. A.; DEL ÁGUILA, V. G.; AGUILERA, M. RAMOS-CORMENZANA, A.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. Production and characterization of the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae* grown on olive mill-waste Waters. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.23, n.1705–1710, 2007.

MOHAČEK-GROŠEV, V.; BOŽAC, R.; PUPPELS, G. J. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. **Spectrochimica Acta Part A**, v.57, p.2815-2829, 2001.

MONTANA POLYSACCHARIDES. **MONTANA POLYSACCHARIDES CORP**, 2018. Disponível em: [http://www.polysaccharides.us/aboutlevan\\_background.php](http://www.polysaccharides.us/aboutlevan_background.php). Acesso em: 10/10/2018.

MOTHÉ, C.G.; AZEVEDO, A.D. **Análise Térmica de Materiais**, São Paulo: Editora São Paulo, 2002, p. 300.

NAIK, M. M.; PANDEY, A.; DUBEY, S. K. Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. **Biodegradation**, v.23, p.775–783, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger, **Princípio de Bioquímica**, 3ªed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NETO, F. R. A.; NUNES, DENISE, S. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003, p.187.

NICHOLS, C. A. M.; GARON, S.; BOWMAN, J.P.; RAGUÉNÈS, G.; GUÉZENNEC, J. Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.1057–1066, 2004.

NOSHLY. ©2011-2018 **Noshly Pty. Ltd**, 2018. Disponível em: <https://noshly.com/additive/424/firming-agent-plus/424/#.W607i2hKjIV> Acesso em: 10/10/2018.

NOVOZYMES. **Novozymes® A/S**, 2015. Disponível em: <https://www.cphi-online.com/hyasis-prod524600.html>. Acesso em: 10/10/2018.

ORHAN, Y. T., C.; KARAGÖZLU, S. SARIOGLU, O. YILMAZ, N. MURAT, S. GIDENDER. A study on the protective activity of kefir against gastric ulcer. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 4, p. 333 – 338, 2013.

OTLES, S.; CAGINDI, O. kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.2, p.54-59, 2003.

PACHEKREPAPOL, U.; LUCEY, J. A.; GONG, Y.; NARAN, R.; AZADI, P. Characterization of the chemical structures and physical properties of exopolysaccharides produced by various *Streptococcus thermophilus* strains. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.5, 2017.

PAIVA, I. M. Caracterização Estrutural e Avaliação da Capacidade Imunomodulatória de Exopolissacarídeos Produzidos por Lactobacilos Isolados de Kefir. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PAU-ROBLOT, C.; LEQUART-PILLON, M.; APANGA, L.; PILARD, S.; COURTOIS, J.; PAWLICKI-JULLIAN, N. Structural features and bioremediation activity of an exopolysaccharide produced by a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated in the Chernobyl exclusion zone. **Carbohydrate Polymers**, v.93, p.154–162, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4ª Edição. São Paulo: Editora CENGAGE Learning, 2010.

PENG, Y.; ZHANG, L.; ZENG, F.; XU, Y. Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p.297–303, 2003.

PETRY, S.; FURLAN, S.; CREPEAU, M.-J.; CERNING, J.; DESMAZEAUD, M. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.8, p.3427–3431, 2000.

PHARMACOSMOS A/S. **The Global Leader in Pharmaceutical Dextran**, 2018. Disponível em: <https://www.dextran.com>. Acesso em: 10/10/2018.

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

PIERMARÍA, J., BENGOCHEA, C., ABRAHAM, A. G., GUERRERO, A. Shear and extensional properties of kefiran, **Carbohydrate Polymers** v.152, p.97–104, 2016.

PINTADO, M.E.; SILVA, J. A. L.; FERNANDES, P.B.; MALCATA, F.X.; HOGG, T. A. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains, **International Journal Food ScienceTechnology**, v.31, p.15–26, 1996.

POP, C.; SALANȚĂ, L.; ROTAR, A. M.; SEMENIUC, C. A.; SOCACIU, C.; SINDIC, M. Influence of extraction conditions on characteristics of microbial polysaccharide kefiran isolated from kefir grains biomass. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.55, n.2, p.121–13, 2016.

PRECHTL, R. M.; WEFERS, D.; JAKOB, F.; VOGEL, R. F. Structural characterization of the surface-associated heteropolysaccharide of *Lactobacillus plantarum* TMW 1.1478 and genetic analysis of its putative biosynthesis cluster. **Carbohydrate Polymers**, v.202, p.236–245, 2018.

QIN, Q.Q.; XIA, B.S.; XIONG, Y.; ZHANG, S.X.; LUO, Y.B.; HAO, Y.L. Structural Characterization of the Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 and Its In Situ Application in Yogurt. **Journal of Food Science**, v.76, p.9, 2011.

RADHOUANI, h.; Gonçalves, c.; Maia, f. r.; Oliveira, j. m.; Reis, r. I. Biological performance of a promising Kefiran-biopolymer with potential in regenerative medicine applications: a comparative study with hyaluronic acid, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.29, p.124, 2018.

RAMOS-SINCHEZ, M. C.; RODRIGUEZ-TORRES, A. Thermolytical Techniques To Characterize Fungal Polysaccharides and Bacterial Lipopolysaccharides. **Biotechnology Progress**, v.7, p.526-533, 1991.

REHM, B. **Alginate**: Biology and applications. Springer Verlag, v.13 R, 2009.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Applied and Industrial Microbiology**, v.8, p. 578-592, 2010.

RIMADA, P. S.; ABRAHAM, A. G. Kefiran improves rheological properties of glucono-d-lactone induced skim milk gels. **International Dairy Journal**, v.16, p.33–39, 2006.

ROBERTS, I. S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Annual Review of Microbiology**. v.50, p.285–315, 1996.

ROBYT, J. F. Essentials of Carbohydrate Chemistry. **Springer-Verlag**, v.2, 1998.

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

ROLLER, S.; DEA, I.C.M. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.12, p.261-277, 1992.

ROTTAVA, I.; BATESINI G.; SILVA, M. F.; LERIN, L.; DE OLIVEIRA, D.; PADILHA, F. F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R. L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.65–71, 2009.

RUAS-MADIEDO, P.; DE LOS REYES-GAVILAN, C.G. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **American Dairy Science Association**, v.88, p.843-856, 2005.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M.; D. MARQUINA. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir System. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.26, p.434–437, 2003.

SACHDEVA, A.; NAGPAL, J. Effect of fermented milk-based probiotic preparations on *Helicobacter pylori* eradication: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.21, n.1, p.45–53, 2009.

SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. **British Food Journal**, v.110, n.3, p.283-295, 2008.

SAVILAHTI, E.; KUITUNEN, M.; VAARALA, O. Pre and probiotics in the prevention and treatment of food allergy. **Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology**, v.8, n.3, p.243 – 248, 2008.

SCJOHNSON. A family company at work for a better world. **Pronto® Limpador Madeiras**, 2018. Disponível em: <https://www.whatsinsidescjohnson.com/pt/pt/brands/pronto/pronto-limpador-madeiras>. Acesso em: 10/10/2018.

SHANG, N.; XU, R.; LI, P. Structure characterization of an exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* RH. **Carbohydrate Polymers** v.91, p.128–134, 2013.

SINGHA, T.K. Microbial extracellular polymeric substances: Production, isolation and applications. **IOSR Journal of Pharmacy**, v.2, n.2, p.276–281, 2012.

SILVA, M. L. C.; IZELI, N. L.; MARTINEZ, P. F.; SILVA, I. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. B.; DEKKER, R. F. H. Purification and structural characterization of (1→3; 1→6)- $\beta$ -D-glucans (*botryospherans*) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Research**, v.61, p.10-17, 2005.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização Química de Glucanas Fúngicas e Suas Aplicações Biotecnológicas. **Química Nova**, v.29, n.1, p.85-92, 2006.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, p.387.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J.; NIEMAN, T. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, p.836.

SOLVAY. **Solvay**, 2018. Disponível em: <https://www.solvay.com/en/product/rheozan-sh>. Acesso em: 10/10/2018.

SUN, Q-L.; WANG, L-Y. SHAN, J-J.; JIANG, R.; GUO, L-H.; ZHANG, Y.; ZHANG, R.; LI, Y. Knockout of the gene (*ste15*) encoding a glycosyltransferase and its function in biosynthesis of exopolysaccharide in *Streptomyces* sp. 139. **Archives of Microbiology**, v.188, p.333–340, 2007.

SUTHERLAND, I. W. **Biotechnology of Microbial Polysaccharides**. Cambridge Studies. Biotechnology 9. Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1990.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnology**, v.16, n.1, p.41-6, 1998.

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

TANIGUCHI, M.; NOMURA, M.; ITAYA, T.; TANAKA, T. Kefiran Production by *Lactobacillus kefiranofaciens* under the Culture Conditions Established by Mimicking the Existence and Activities of Yeast in Kefir Grains. **Food Science Technology Research**, v.7, n.4, p.333–337, 2001.

TIDONA, F.; FRANCOLINO, S.; ZHANG, H.; TARINI, G.; CUI, S. W.; GIRAFÀ, G.; CARMINATI, D. Design of a starter culture to produce a reduced-fat soft cheese with added bio-value. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.55, n.1, p.33–39, 2016.

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

TOBA, T.; UEMURA, H.; MUKAI, T.; FUJII, T.; ITOH, T.; ADACHI, S., A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing *Lactobacillus kefiranofaciens* isolated from kefir grains, **Journal of Dairy Research**, v.58, p.497–502, 1991.

TONG, J. L.; RAN, Z. H.; SHEN, J.; ZHANG, C. X.; XIAO, S. D. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.25, n.2, p.155 – 168, 2007.

TOPUZ, E.; DERIN, D.; CAN, G.; KÜRKLÜ, E. Effect of oral administration of Kefir on serum proinflammatory cytokines on 5-FU induced oral mucositis in patients with colorectal cancer. **Investigational New Drugs**, v.26, p.567 – 572, 2008.

UNILEVER. **Sorvete KIBON® Sorveteria Tentação**, 2018.

Disponível em: <https://www.kibon.com.br/nossas-marcas/sorveteria/sorveteria-tenta%C3%A7%C3%A3o.html>. Acesso em: 10/10/2018.

VERCELLOTTI, J. R.; ANGELO, A. J. ST.; SPANLER, A. M. **Lipid oxidation in foods: A overview**. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, cap. 1, 1992.

VINDEROLA, G., PERDIGO, G.; DUARTE, J.; FARNWORTH, E.; CHANTAL MATAR. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity. **Cytokine**, v.36, p.254–260, 2006.

VOGEL, A. **Análise Química Quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2002, p.462.

VRESE, M.; PHILIPPE, M. R. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. **The Journal of Nutrition**, v.137, n.3, p.803 – 811, 2007.

WANG, K. Y.; LI, S. N.; LIU, C. S.; PERNG, D. S.; SU, Y. C.; WU, D. C.; JAN, C. M.; LAI, C. H.; WANG, T. N.; WANG, W. M. Effects of ingesting *Lactobacillus-* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. **American Society for Clinical Nutrition**, v.80, n.3, p.737 – 741, 2004.

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

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

WANG, S.Y.; CHEN, H.C.; LIU, J.R.; CHEN, M.J. Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese kefir and viili starters. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.3798-3805, 2008b.

WANG, Y; LI, C.; LIU, P.; AHMED, Z.; XIAO, P.; BAI, X. Physical Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 Isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p.895–903, 2010.

WANG, S.-Y. CHEN, K-N; LO, Y-M; CHIANG, M-L; CHEN, H-C; LIU, J-R.; CHEN, M-J. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. **Food Microbiology**, p.1-12, 2012.

WANG, X.; ZHANG, L.; WU, J.; XU, W.; WANG, X.; LÜ, X. Improvement of simultaneous determination of neutral monosaccharides and uronic acids by gas chromatography. **Food Chemistry**, v.220, p.198–207, 2017.

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

WESCHENFELDER, S.; PEREIRA, G. M., CARVALHO, H.H.C., WIEST J.M. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.473-480, 2011.

WHITFIELD, C.; VALVANO, M.A. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, v.35, p.135–246, 1993.

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, n.4, p.383 - 389, 2005.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 65-67, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 211-215, 1963b.

YANG, L.; ZHANG, Li-M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v.76, p.349–361, 2009.

YANG, S-T. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. **Elsevier Science**, 1 st Edition, 2011, p. 569.

YEMM, E. W.; FOLKES, B. F. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, n.3, 1954.

YANG, Y.; FENG, F.; ZHOU, Q.; ZHAO, F.; DU, R. ZHOU, Z.; HAN, Y. Isolation, Purification, and Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Leuconostoc Citreum* N21 from Dried Milk Cake. **Transactions of Tianjin University**, 2018.

YOKOI, H.; WATANABE, T.; FUJII, Y.; TOBA, T.; ADACHI, S. Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains, **Journal of Dairy Science**, v.73, p.1684–1689, 1990.

YOKOI, H.; WATANABE, T.; FUJII, Y.; MUKAI, T.; TOBA, T.; ADACHI, S. Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, p.257-264, 1991.

YOKOI, H.; WATANABE, T. Optimum culture conditions for production of kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.74, p.327–329, 1992.

ZAJŠEK, K.; KOLAR, M.; GORŠEK, A. Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains international journal of dairy technology. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.4, p.544-548, 2011.

ZHAO, S.; CAO, F.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; ZHANG, F.; LIANG, X. Structural Characterization and Biosorption of Exopolysaccharides from *Anoxybacillus* sp. R4-33 Isolated from Radioactive Radon Hot Spring. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p.2732–2746, 2014.

ZHAO, H.; WANG, J.; LV, F.; BIE, X.; LU, Z. Chemical Characterization and Antitumor Activity of na Exopolysaccharide from *Pholiota Squarrosa* Quel. AS 5.245. **Food Science Biotechnology**, v.24, n.2, p.659-664, 2015.

ZHANG, B-Z.; INNGJERDINGEN, K. T.; ZOU, Y-F.; RISE, F.; MICHAELSEN, T. E.; YAN, P-S.; PAULSEN, B-S. Characterisation and immunomodulating activities of exopolysaccharides from submerged cultivation of *Hypsizigus marmoreus*. **Food Chemistry**, v.163, p.120–128, 2014.

ZHANG, Z.; LIU, Z.; TAO, X.; WEI, H. Characterization and sulfated modification of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its biological activities. **Carbohydrate Polymers**, v.153, p.25–33, 2016.

ZHANG, J.; CAO, Y.; WANG, J.; GUO, X.; ZHENG, Y.; ZHAO, W.; MEI, X.; GUO, T.; YANG, Z. Physicochemical characteristics and bioactivities of the exopolysaccharide and its sulphated polymer form *Streptococcus thermophilus* GST-6. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 368-375, 2016.

ZHANG, H.; WANG, X.; LI, R.; SUN, X.; SUN, S.; LI, Q.; XU, C. Preparation and Bioactivity of Exopolysaccharide from an Endophytic Fungus *Chaetomium* sp. Of the Medicinal Plant *Gynostemma Pentaphylla*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 51, p. 477-482, 2017.

ZHOU, Q.; FENG, F.; YANG, Y.; ZHAO, F.; DU, R.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.107, p.2234–2241, 2018.

**ANEXO I - ALGUNS MICRO-ORGANISMOS PRESENTES EM VÁRIOS TIPOS DE GRÃOS DE KEFIR**

<b>Bactéria ácido-lática</b>	<b>Leveduras</b>	<b>Outros</b>	<b>Referências</b>
<i>Lactobacillus kefiranum</i> , <i>Lactobacillus Kefieranofaciens</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus parakefi</i>	N. D.	N. D.	TAKIZAWA et al., 1994.
<i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus delbruekii subsp. lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> ,	N. D.	<i>Enterococcus facium</i> , <i>Acetobacter spp.</i>	HABIBI; SOLEIMANIAN-ZAD; ZEINODDIN, 2011.
<i>Lactobacillus Kefieranofaciens</i> , <i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida kefir</i> .	N. D.	TANIGUCHI et al., 2001.
<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Leuconostoc. mesenteroides</i> .	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i>	N. D.	LIN; CHEN; LIU, 1999.
<i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus lactis subsp. Lactis</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i>	N. D.	PINTADO, et al., 1996.

N. D. = Não determinado ou não descrito.

Bactéria ácido-lática	Leveduras	Outros	Referências
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces turicensis</i> , <i>Pseudomonas fermentans</i>	N. D.	CHEN, et al., 2009
<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus lactis subsp. lactis</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Cryptococcus humicolu</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Cryptococcus humicolus</i>	N. D.	WITTHUHN; SCHOEMAN; BRITZ, 2005.
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> . <i>Leuconostoc lactis subsp. cremoris</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces turicensis</i> , <i>Pichia fermentans</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>Pichia fermentans</i>	N. D.	WANG et al., 2008b.

N. D. = Não determinado ou não descrito.

---

**ANEXO II - MICRORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR BIOLOGICUS**


---

*Lactobacillus (Lb) casei* subsp. *rhamnosus*  
*Lb. casei* CCB 110  
*Lb. paracasei* CCB111  
*Lb. acidophilus*, *Lb. Helveticus*  
*Lb. Kefiri*  
*Lb. Kefiranofaciens*  
*Lb. Delbrueckii*  
*Lb. Gallinarum*  
*Lb. Fornicalis*  
*Lb. leichmanni*  
*Lb. kalixensis*,  
*Lb. Jensenii*  
*Lb. Parakefiri*  
*Lb. Buchneri*  
*Lb. Hamsteri*  
*Lb. Iners*  
*Lb. algidus*  
*Lb. hilgardii*  
*Lb. acidifarinae*  
*Lb. fermentum*  
*Lb. kimchicus*  
*Lb. equicursoris*  
*Lb. amylolyticus*  
*Lb. farraginis*  
*Lb. curieae*  
*Lb. namurensis*  
*Lb. kitasatonis*  
*Lb. taiwanensis*  
*Lb. senioris*  
*Lb. crispatus*

*Lb. Plantarum*  
*Lb. diolivorans* CCB120  
*Leuconostoc mesenteroides* CCB 121,  
*Lactococcus lactis* CCB 210  
*Streptococcus suis*  
*Streptococcus uberis*  
*Bifidobacterium longum*  
*Bifidobacterium breve*,  
*Acetobacter orientalis*  
*Enterococcus faecium* CCB 310  
*Bacillus sporothermodurans*  
*Brochothrix thermosphacta*  
*Pseudomonas fragi*  
*Chryseobacterium balustinum*  
*Thermus thermophilus*  
*Streptococcus thermophilus*  
*Kluyveromyces marxianus*  
*Kazachistania unispora* CCB 410  
*Candida kefir*  
*Candida sake* CCB 411  
*Pichia fermentans* CCB 412  
*Kazachstania servazzii*  
*Kluyveromyces lactis*  
*Saccharomyces Cerevisiae* CCB 413  
*Saccharomyces cerevisiae* TCI 245  
*Saccharomyces sp.* TCI250  
*Candida sp. F15*  
*Galactomyces candidum*  
*Saccharomyces kudriaavzevii*  
*Cryptococcus curvatus*  
*Streptococcus salivarius*

---

**ANEXO III - ESTUDOS REALIZADOS COM O KEFIRANO, SUAS APLICAÇÕES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

<b>Composição estrutural</b>	<b>Meio para obtenção</b>	<b>Análises Químicas</b>	<b>Massa Molar</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Referências</b>
Glc e Gal 1.0:1.0 →6)-β-D-Glcp-[1→2(6)]-β-D-Galp-(1→4)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→	Grãos de kefir em leite de vaca	Oxidação com periodato <sup>a</sup> / hidrólise enzimática <sup>b</sup>	20.600 g/mol	-	KOOIMAN, 1968.
Glc e Gal 1.0:0.88 a 0.99 -	Grãos de kefir em sete meios com leite de vaca e adicionais	CLAE	4x10 <sup>6</sup> e 1.0x10 <sup>6</sup> g/mol	-	YOKOI et al., 1990.
Glc e Gal 1.0:0.98 Glc-(1→4-Gal-(1→4)-Glc-(1→3)-Gal-(1→6)-Glc-(1→6)-Gal-(1→2,6)-Gal-(→	<i>Lactobacillus</i> sp. KPB-167B em leite de vaca	Cromatografia gasosa/ <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H RMN/ CLAE	1.6x10 <sup>6</sup> g/mol	-	YOKOI et al., 1991.
Gal e Glc 1.1:0.9 -	<i>Lactobacillus</i> sp. LM-17 em meio MRSm	Dicroísmo circular, RMN e IV	-	-	MICHELI; UCCELLETTI; PALLESCHI; CRESCENZI, 1999.

Composição estrutural	Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
<i>D</i> -Gal e <i>L</i> -Ram 2.0:1.0 →3)-β- <i>D</i> -Galp-[β- <i>D</i> -Galf2Ac-(1→6)](1→3)-α- <i>D</i> -Galp-(1→3)-α- <i>L</i> -Ramp-(1→2)-α-Ramp-(1→2)-α- <i>D</i> -galp-(1→	<i>Streptococcus thermophilus</i> S3 em leite de vaca reconstituído	CLG-EM/ RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H/ RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H 2D	5.9x10 <sup>3</sup> g/mol	-	FABER; HAAK; KAMERLING; VLIEGENTHART, 2001.
Glc e Gal 1.0:0.94 -	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em leite	Método Fenol-Sulfurico <sup>c</sup>	-	-	FRENGOVA; SIMOVA; BESHKOVA; SIMOV, 2002.
Glc e Gal 1.00:1.14	Grãos de kefir em leite	CFG	1.7x10 <sup>6</sup> g/mol	-	LIU; CHEN; LIN, 2002.
Glc e Gal 1.00:0.43	Grãos de kefir em extrato de soja				
Glc e Gal 1.00:1.05 →6)-β- <i>D</i> -Glc p-(1→6)-β- <i>D</i> -Galp-[(1→2)-β- <i>D</i> -Glc p]-(1→4)-α- <i>D</i> -Galp-(1→3)-β- <i>D</i> -Galp-(1→4)-β- <i>D</i> -Glc p-(1→	<i>L. kefiranofaciens</i> WT-2B em meio PYG10	CG-EM/ CPG/ RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H 1D e RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H 2D	7.6x10 <sup>5</sup> g/mol	Redução do aumento da pressão arterial/ Redução de colesterol LDL e Total e do níveis de triglicerídeos	MAEDA et al., 2004.

Composição estrutural	Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
EPS I Glc e Gal 1:4 -	<i>L. kefiranofaciens</i> em meio agar com modificações	CPG/ CFGAE-IR/ IV/ CLAE	2.4x10 <sup>5</sup> g/mol	-	WANG; BI, 2008.
EPS II Glc e Gal 1:10 -			1.5x10 <sup>5</sup> g/mol		
Glc e Gal -	<i>L. kefiranofaciens</i> em MRSm	IV/ CG-EM/ ATG	-	Emulsificante e floculante	WANG et al., 2008.
Glc e Gal -	Grãos de kefir em leite de vaca ou proteína	CFG-IR/ CCD	10 <sup>7</sup> g/mol	Gelificante	PIERMARIA; CANAL; ABRAHAM, 2008.
Glc e Gal 1.0:0.7 -	Grãos de kefir em leite fresco	EC-UV	-	-	ZAJŠEK, KOLAR; GORSEK, 2011
Glc e Gal $\beta$ -ligações -	Grãos de kefir em leite de vaca desnatado	IV	-	Formador de filmes	GHASEMLOU; KHODAIYAN; OROMIEHIE, 2011.

Composição estrutural	Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
Glc e Gal 1.0:1.1 $\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)[ $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 2)-] $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$	Grãos de kefir em soro de queijo	CFG/ CG-EM/ RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ / HMBC	$1.35 \times 10^6$ g/mol	-	GHASEMLOU et al., 2012.
D-glicose 92% $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) e 8% $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)	<i>Lactobacillus</i> sp. em MRSm	CFG/ RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ / CLAE-IR	$7.23 \times 10^5$ e $8.14 \times 10^5$ g/mol	Capacidade imunomodulatória em camundongos	PAIVA, 2013.
Glc e Gal $\beta$ -ligações	Gãos de kefir em leite de vaca desnatado	IV	-	Preparação de embalagens	ESNAASHARI et al., 2014.
Glc e Gal $\beta$ -ligações -	Grãos de kefir em leite de vaca desnatado	IV/ ATG	-	Nanofibras	ESNAASHARI, et al., 2014.
Glc e Gal 1.0:1.88 -	Grãos de kefir em leite de vaca desnatado esterilizado	CG-DIC/ IV/ ATG	-	Antioxidante	CHEN et al., 2015.

Composição estrutural	Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
Glc e Gal -	<i>L. lactis</i> e <i>L. mesenteroides</i> em leite de vaca	IV	-	-	GRADOVA; KHOKHLACHEVA; MURZINA; MYASOYEDOVA, 2015.
Glc e Gal 0.94:1.1	Gãos de kefir em leite de vaca desnatado	CLAE-IR/ IV/ CETAE-IR	$2.4 \times 10^6$ e $1.5 \times 10^7$ g/mol	Emulsificante e estabilizante	POP et al., 2016.
Glc e Gal 1.21:1.00 -	Grãos de kefir em leite de vaca	CFG-IR/ CETAE-DAD	$6.0 \times 10^6$ g/mol	Propriedades realógicas semelhantes a MC e gomas locuste e guar	PIERMARÍA; BENGOCHEA; ABRAHAM; GUERRERO, 2016.
Glc e Gal -	Grãos de kefir em leite de vaca desnatado	IV/ ATG (DSC)	-	Nanofibras com álcool polivinílico	FAR; ZIYADI, 2016.
Man, Ara, Glc, Gal, e Ram (59.12%, 15.77%, 12.68%, 11.79% e 0.64%)	<i>L. kefiranofaciens</i> DN1 em MRSm	CETAE-DAD	-	Antimicrobiano para <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. Enteritidis</i> .	JEONG et al., 2017.

Composição estrutural	Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
Glc e Gal →6)-β-D-Glcp-(1→6)-β-D-Galp- [(1→2)-β-D-Glcp]-(1→4)-α-D-Galp- (1→3)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glcp- (1→	Grãos de kefir em leite de vaca	RMN <sup>1</sup> H	-	Antimicrobiano sobre <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>S. aureus</i>	JENAB; ROGHANIAN; EMTIAZI; GHAEDI, 2017.
Glc e Gal β-configuração	Grãos de kefir em leite de vaca desnatado	RMN <sup>1</sup> H/ IV/ EPX/ CETAE/ ATG	5.34x10 <sup>5</sup> e 3.57 x10 <sup>5</sup> g/mol	Atividade citotóxica em células de fibroblastos de ratos	RADHOUANI et al., 2018.
Gal e Glc [→6)-β-D-Glcp-(1→] [→3)-β-D-Galp-(1→] →4)-β-D-Glcp-(1→] [→2,6)-β-D-Galp-(1→] [β-D-Glcp-(1→] [→4)-α-D-Galp-(1→]	Grãos de kefir em soro de queijo com complementações	CETAE-ELM- IR/ RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H/ IV/ Raman	-	Antimicrobiano sobre <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> , <i>E.</i> <i>coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. typhimurium</i> .	BLANDÓN et al., 2018.
Glc e Gal 1.0:0.9 -	Grãos de kefir em leite de vaca desnatado UHT	CETAE-ELM- IR/ CG-EM/	6.71x10 <sup>5</sup> g/mol	-	EXARHOPOUL OS; RAPHAELIDES; KONTOMINAS, 2018.

a. CHANDA; JONES; PERCIVAL, 1950; b. KOOIMAN, 1953; c. DUBOIS et al., 1956.

**ANEXO IV – EPSs E SUAS UTILIZAÇÕES EM PRODUTOS COMERCIAIS DA INDÚSTRIA**

<b>EPS</b>	<b>Tipo de Micro-organismo</b>	<b>Composição Estrutural</b>	<b>Aplicações</b>		<b>Referências</b>	
Alginato	<i>Azotobacter</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.	Ácido gulurônico e ácido manurônico	SILVERCEL® – JOHNSON&JOHNSON		Curativo antimicrobiano  Molde para próteses  Estabilizante	JOHNSON&JOHNSON, 2004;  DENCRI, 2018.  UNILEVER, 2018.
			ALGINATO DENCRI® - Dencril			
			Sorvete KIBON® - Unilever			
			GRINDSTED® Alginato - DuPont	GRINDSTED® Alginato IC	Melhoria na textura (sorvetes)	DANISCO® DUPONT™, 2018;  TAKIZAWA et al., 1994; REHM, 2009;
				GRINDSTED® Alginato FB	Estabilizante; previne sinérese (recheios de padaria)	

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações			Referências
Alginato	<i>Azotobacter</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp	Ácido gulurônico e ácido manurônico	GRINDSTED® Alginato - DuPont	GRINDSTED® Alginato BC	Melhoria na textura; estabilizante para cozimento, congelamento e descongelamento (cremes)	DANISCO® DUPONT™, 2018;  TAKIZAWA et al., 1994; REHM, 2009;
				GRINDSTED® Alginato LFS	Estabilizante de emulsões; melhoria na fusão e liberação controlada (produtos light)	
				GRINDSTED® Alginato FD	Gelificante; espessante; formador de filme (cremes, frutas estruturadas, pastas de pigmentos)	

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações			Referências
Alginato	<i>Azotobacter</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp	Ácido gulurônico e ácido manurônico	GRINDSTED® Alginat - DuPont	GRINDSTED® Alginat PH	Gelificante; espessante; formador de filme (aplicações farmacêuticas; controle do refluxo gástrico; cicatrização de feridas; impressão dental)	DANISCO® DUPONT™, 2018;  TAKIZAWA et al., 1994; REHM, 2009;
				PROTANAL® LFR 60	Antirefluxo (suspensão);	
				PROTANAL® LF10/60FT	Tratamento de feridas	
				MANUCOL® DH(P)		
				PROTANAL® PH6160	Estabilizantes, desintegrantes e formadores de matriz	

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações			Referências
Alginato	<i>Azotobacter</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp	Ácido gulurônico e ácido manurônico	GRINDSTED® Alginat - DuPont	PROTANAL® PH1033	Estabilizantes, desintegrantes e formadores de matriz	DANISCO® DUPONT™, 2018;  TAKIZAWA et al., 1994; REHM, 2009.
				PROTANAL® CR8133	Liberação controlada	
				MANUCOL® LKX		
				MANUCOL® 8233		
				PROTANAL® KF200FTS	Dental	
				PROTANAL® LF200FTS		
				PROTANAL® HF120RBS		
				PROTANAL® KF200RBS		
				MANUCOL® DM		

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações			Referências	
Celulose	<i>Acetobacter</i> spp., <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	Glicose	CURATEC®	Curatec Compressa com Emulsão de Petrolatum	Gazes para cicatrização de feridas	LM FARMA, 2002;  COLENCI, 2017; BROWN, 1998; REHM, 2009; YANG, 2011; CHAWLA et al., 2009; BAE et al., 2004;  SCJOHNSON, 2018;  CPKELCO, 2018.	
				Curatec AGE 30 Rayon®			
				Curatec Hidrocolóide®			
			PRONTO® SCJohnson	PRONTO® Limpador Madeiras 35*7511	Espessante		
			CEKOL® CP Kelco	CEKOL® Cellulose Gum	Melhoria de textura em bebidas; uso em cosméticos		
	CEKOL® 30000	Espessante, estabilizante e dispersante					

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações			Referências
Curdlana	<i>Agrobacterium</i> spp., <i>Agrobacterium</i> biovar 1, <i>Rhizobium</i> spp., <i>Cellulomonas</i> spp	Glicose	Curdlan 424® Noshly	Curdlan 424	Reafirmante, gelificante, estabilizante e espessante em alimentos	NOSHLY, 2018. REHM, 2009; YANG, 2011 MCINTOSH; STONE; STANISICH, 2005; FOREVER HEALTH FOOD, 2009.
			Vegetarian - Forever Health	Konjac Vegan Seaweed Scallop	Goma para preparos veganos	
				Vegan Codfish Ball		
				Vegan Fish Rol		
Dextrana	<i>Leuconostoc</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	Glicose, Manose, Glicuronato, piruvato	PHARMACO SMOS PHARMACO SMOS	Dextran 1	Excipiente para formulações farmacêuticas	REHM, 2009; YANG, 2011 REHM, 2010; PHARMACOSMOS, 2018.
				Dextran 40, 60 e 70	Substituição de perda de sangue, substituição de plasma, profilaxia de trombose, expansão de volume, melhoria reológica	

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações			Referências
Gelana	<i>Sphingomonas</i> spp.	Glicose, Ramnose, Ácido glucurônico (glucuronato)	GRINDSTED ® GELLAN MAS 100		Estabilizante (bebidas não lácteas)	DANISCO® DUPONT™, 2018;  CPKELCO, 2018;
			CPKelco	GELZAN™	Gelificante, texturizante, estabilizante, suspensor, formador de filme e estruturador. (matriz de crescimento para organismos clínicos e não clínicos)	
				KELCOGEL® gellan gum	Gelificante, texturizante, estabilizante, suspensor, formador de filme e estruturador (alimentos, cuidados pessoais, produtos de limpeza doméstica)	REHM, 2009; REHM, 2010.

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações			Referências	
Hialurana	<i>Streptococcus</i> spp. <i>Pasteurella multocida</i>	Ácido glucurônico (glucuronato), N-Acetilglicosmina	ROC® Johnson&Johnson	PRO-CORRECT CREME® ROC	Tratamento de rugas	JOHNSON&JOHNSON, 2018.	
			Novozymes	HYASIS®	Estética, cuidados articulares, oftalmologia, cuidados com a pele.		NOVOZYMES, 2015;
			ANIKA THERAPEUTICS ANIKA THERAPEUTICS	ELEVESS® Dermal Filler	Tratamento de rugas injetável	ANIKA THERAPEUTICS, 2018;	
				HYALOMATRIX® Tissue Reconstruction Matrix	Fibra para tratamento de ferimentos		REHM, 2010.
				HYALOGAN® Biodegradable Wound Dressing	Microesferas para tratamento de ferimentos		
HYALOSAFE® Film Wound Dressing	Curativo transparente para tratamento de ferimentos						

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações			Referências
Levana	<i>Alcaligenes viscosus</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Bacillus subtili</i>	Frutose	MONTANA POLYSACCH ARIDES	FRUCTANS	Filmes para aumentar a validade de alimentos Adesivos e cosméticos.	REHM, 2009; SENTHIKUMAR ;  MONTANA POLYSACCHARI DES, 2018.
Succinogl icana	<i>Agrobacterium</i> biovar 1, <i>Agrobacterium</i> spp. <i>Sinorhizobium</i>	Glicose, Galactose Acetato Piruvato, Succinato 3- hidroxibutirato	SOLVAY	RHEOZAN SH®	Espessante, estabilizante (cosméticos)	SOLVAY, 2018;
			Ametech	Rheozan	Espessante (alimentos)	AMETECH, 2018;
			JOHNSON&J OHNSON	RoC® RETINOL CORREXION® Deep Wrinkle Night Cream	Anti-rugas	JOHNSON&JOH NSON, 2016;  REHM, 2010.

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações		Referências	
Xantana	<i>Xanthomonas</i> spp.	Glicose, manose, glucuronato, piruvato	GRINDSTED® Xanthan	GRINDSTED® Xanthan SAV	Espessante e suspensor (maionese, molhos, ketchup, sopas)	DANISCO® DUPONT™, 2018;  REHM, 2009;  REHM, 2010;  IMESON, 2011;  YANG, 2011.
				GRINDSTED® Xanthan SAV SOFT		
				GRINDSTED® Xanthan BEV	Espessante e suspensor (bebidas de frutas, bebidas instantâneas)	
				GRINDSTED® Xanthan BAK	Espessante e suspensor (Pães, bolos, massas, biscoitos)	
				GRINDSTED® Xanthan DAI	Espessante e suspensor (laticínios e bebidas de soja)	
				GRINDSTED® Xanthan MAS	Espessante e suspensor (carnes, salmouras, salsichas, queijos processados)	

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações			Referências
Xantana	<i>Xanthomonas</i> spp.	Glicose, manose, glucuronato, piruvato	GRINDSTED® Xanthan	GRINDSTED® Xanthan SAV, BEV, MAS Clea	Espessante e suspensor (produtos transparentes: bebidas, sobremesas, geleias)	DANISCO® DUPONT™, 2018;  REHM, 2009;  REHM, 2010;  IMESON, 2011;  YANG, 2011;  SCJOHNSON, 2018;  CPKELCO, 2018.
				GRINDSTED® Xanthan SM	Espessante e suspensor (Salmouras)	
				GRINDSTED® Xanthan RB	Espessante e suspensor (hipoalérgicos)	
				GRINDSTED® Xanthan Pharma	Espessante e suspensor (produtos farmacêuticos)	
			PATO® SCJohnson	PATO® Líquido 35*7632	Espessante (Abrasivos sanitários)	
			CPKelco	KELTROL® Advance Performance Xanthan Gum	Espessante e estabilizante (alimentos sem glúten)	

EPS	Tipo de Micro-organismo	Composição Estrutural	Aplicações		Referências	
Xantana	<i>Xanthomonas</i> spp.	Glicose, manose, glucuronato, piruvato	CPKelco	KELDENT® Xanthan Gum	Espessante e estabilizante (cremes dentais e higiene bucal)	DANISCO® DUPONT™, 2018;
				KELFLO® Xanthan Gum	Espessante e estabilizante (alimentação animal)	REHM, 2009;
				KELZAN® Xanthan Gum	Espessante e estabilizante (petrolíferas)	REHM, 2010;
				XANTURAL® Xanthan Gum	Espessante e estabilizante (aplicações farmacêuticas)	IMESON, 2011;
				XANVIS®	Espessante e estabilizante (petrolífera e fluidos de perfurações)	YANG, 2011;  SCJOHNSON, 2018;  CPKELCO, 2018.

**ANEXO V - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE EPSs IDENTIFICADAS POR CG A PARTIR DO ANO 2000**

EPS	Composição Monossacarídica				Referência
	ES1	(%)	ES2	(%)	
Frações ES1 e ES2 de <i>Aphanothece</i> <i>halophytica</i> GR02	Ramnose	0,0	Arabinose	1,0	(LI; LIU; SHU, 2001)
	Fucose	0,0	Fucose	2,0	
	Monose	0,0	Monose	1,5	
	Glicose	1,0	Glicose	2,8	
	Galactose	0,7	Ácido glucurônico	15,7	
	Ácido glucurônico	3,5			
	EPS		(%)		
EPS de <i>Cryptomonas</i> <i>obovata</i>	Fucose		41,6	(GIROLDO; VIEIRA, 2002)	
	N-acetil-galactosamina		26,0		
	Ramnose		15,3		
	Galactose		4,4		
	Ácido glucurônico		4,3		
	Manose		3,6		
	Xilose		2,7		
Glicose		2,1			
	EPS		(%)		
EPS de <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	Glicose		36,7	(KOBAYAS HI et al., 2002)	
	Galactose		20,1		
	Manose		9,3		
	Ácido glucurônico		33,9		

EPS	Composição Monossacarídica				Referência		
	Fração 1	(%)	Fração 2	(%)			
EPS de <i>Thalassiosira</i> sp.	Ramnose	18,3	Rhamnose	3,3	(GIROLDO; VIEIRA, 2003)		
	Fucose	7,7	Fucose	2,1			
	Xilose	6,2	Xylose	19,5			
	Manose	51,8	Mannose	57,4			
	Galactose	4,4	Galactose	4,2			
	Glicose	3,8	Glucose	0,8			
	Ácido glucurônico	1,7	Ácido glucurônico	5,5			
	N-acetylgalactosamine	2,0	Ácido Galacturônico	4,9			
N-acetilglicosamina	3,8	N-acetil-glicosamina	2,0				
EPS de <i>Ganoderma</i> <i>tsugae</i>	CEP	(%)	EPF1	(%)	EPF2	(%)	(PENG; ZHAN, ZENG, XU, 2003)
	Xilose	3,3	Xilose	2,9	Xilose	4,5	
	Manose	2,0	Manose	16,1	Manose	1,3	
	Galactose	59,6	Galactose	66,7	Galactose	58,0	
	Glicose	17,4	Glicose	9,4	Glicose	24,5	
	N-acetil-glicosamina	8,1	N-acetil-glicosamina	4,3	N-acetil-glicosamina	3,8	
EPS de bactérias marinhas da Antártica	EPS	(%)					(NICHOLS et al., 2004)
	Glicose		12,8				
	Ácido galacturônico		6,4				
	Arabinose		1,0				
	Galactose		1,3				
Ramnose		1,1					

EPS	Composição Monossacarídica				Referência
	Fração 1	(%)	Fração 2	(%)	
EPS de <i>Cryptomonas tetrapyrenoidosa</i>	Ramnose	9,0	Ramnose	0,8	(GIROLDO; VIEIRA; PAULSEN, 2005)
	Fucose	24,3	Fucose	8,6	
	Xilose	4,7	Xilose	0,4	
	Manose	15,4	Manose	0,8	
	Galactose	13,7	Galactose	36,0	
	Glicose	3,5	Glicose	0,5	
	Ácido glucurônico	4,1	Ácido glucurônico	47,0	
	Ácido galacturônico	0	Ácido galacturônico	4,5	
	N-acetilgalactosamina	8,6	N-acetilgalactosamina	0,2	
	N-acetilglicosamina	16,8	N-acetilglicosamina	1,1	
	EPS-m	(%)	EPS-c	(%)	
EPS de biossíntese em <i>Streptomyces</i> sp. 139	Galactose	45,0	Galactose	51,8	(SUN at al. 2007)
	Arabinose	37,3	Arabinose	26,1	
	Manose	3,3	Manose	5,8	
	Fucose	2,1	Fucose	2,4	
	Xilose	2,2	Xilose	3,2	
	Glicose	0	Glicose	1,0	
	Ramnose	6,6	Ramnose	6,4	
Ácido Galacturônico	3,1	Ácido Galacturônico	2,9		

EPS	Composição Monossacarídica										Referência			
	EPS 1						EPS 2							
		(%)						(%)						
EPS de <i>Paenibacillus jamilae</i>	Glicose	36,1						Glicose						(MORILLO et al., 2007)
	Galactose	16,4						Galactose						
	Manose	14,8						Manose						
	Xilose	8,2						Xilose						
	Arabinose	9,8						Arabinose						
	Ramnose	9,8						Ramnose						
	Fucose	4,9						Fucose						
	EPSs	L1 (%)	L2 (%)	L3 (%)	L4 (%)	L5 (%)	L6 (%)	L7 (%)	L8 (%)	L9 (%)	L10 (%)			
EPSs de <i>Lentinula edodes</i>	Glicose	55,4	23,1	50,9	56,2	47,1	68,9	47,3	56,3	88,8	55,5	(LO; KANG; WANG; CHANG, 2007)		
	Manose	32,2	49,2	31,8	26,8	36,2	20,0	33,5	26,7	7,2	30,9			
	Arabinose	6,0	11,1	8,2	7,7	6,7	5,4	8,4	7,7	2,2	6,4			
	Xilose	4,8	10,6	5,8	5,5	5,2	3,8	5,8	5,4	1,1	4,5			
	Galactose	1,4	5,0	2,5	3,5	4,3	1,4	3,7	3,1	0,0	1,8			
	Fucose	0	0,5	0,2	0	0,2	0,1	0,5	0,1	0,1	0,2			
	Ramnose	0	0,2	0,2	0	0,1	0,2	0,5	0,3	0,4	0,4			
	EPS						(%)							
EPS de <i>Paecilomyces cicadae</i> (Miq.) Samson (Ascomycetes)	Ramnose						0.6						(HE et al., 2010)	
	Arabinose						13.1							
	Fucose						1.30							
	Xilose						21.3							
	Manose						46.5							
	Glicose						6.0							
	Galactose						10.2							

EPS	Composição Monossacarídica				Referência
EPS de <i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> KB28	EPS		(%)		(HEE; CHOI; KIM; HAN, 2011)
	Glicose		70,0		
	Galactose		18,0		
	Manose		7,0		
	Xilose		5,0		
	Arabinose ramnose		4,0 1,0		
EPS de <i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> P2B	EPS 1	(%)	EPS 2	(%)	(NAIK; PANDEY; DUBEY, 2012)
	Arabinose	4,0	Ramnose	2,0	
	Xilose	9,0	Arabinose	8,0	
	manose	3,0	Xylose	15,0	
	galactose	32,0	Mannose	8,0	
	glicose	49,0	Galactose Glicose	26,0 37,0	
EPS de <i>Cronobacter</i> <i>sakazakii</i>	EPS		(%)		(JAIN; MODY; MISHRA; JAH, 2012)
	Glicose		14,0		
	Galactose		14,0		
	Manose		24,0		
	Xilose		20,0		
	Arabinose		1,9		

EPS	Composição Monossacarídica				Referência
	FR-I	(%)	FR-II	(%)	
EPS de <i>Pleurotus eryngii</i>	Arabinose	11,2	Arabinose	0,2	(JING; MAO. GENG; XU, 2013)
	Raamnose	0,9	Raamnose	1,6	
	Ribose	1,8	Ribose	0,3	
	Xilose	3,5	Xilose	0,3	
	Talose	10,4	Talose	3,8	
	Galactose	15,1	Galactose	43,6	
	Glucose	11,1	Glucose	5,6	
	Manose	32,9	Manose	35,0	
EPS de <i>nterobacter ludwigii</i>	EPS		(%)		(PAU-ROBLOT et al., 2013)
	Fucose		20,0		
	Glicose		20,0		
	Galactose		40,0		
	Ácido glucurônico		20,0		
EPS de <i>Pseudomonas stutzeri</i> AS22	EPS		(%)		(MAALEJ et al., 2014)
	Glicose		36,9		
	Manose		33,9		
	Ramnose		29,1		
EPS de <i>Anoxybacillus</i> sp. R4-33	EPS		(%)		(ZHAO et al., 2014)
	Manose		50,0		
	Glicose		45,0		

EPS	Composição Monossacarídica				Referência	
EPS de <i>Flammulina velutipes</i> SF-06	EPS		(%)		(MA et al., 2015)	
	Ramnose		61,4			
	Glicose		28,0			
	Galactose		10,5			
EPS de <i>Cordyceps sinensis</i>	EPS		(%)		(HU; JIANG; HUANG; SUN, 2016)	
	Glicose		99,0			
	Manose		1,0			
EPS de <i>Lactobacillus plantarum</i> ZDY2013	EPS		(%)		(ZHANG; LIU; TAO; WEI, 2016)	
	Galactose		98,3			
	Xilose		1,7			
EPS de <i>Hericium erinaceus</i> SG-02	EPS	(%)	IPS	(%)	(CUI et al., 2016)	
	Arabinose	1,3	Ramnose	1,8		
	Manose	9,4	Xilose	2,4		
	Galactose	18,9	Manose	4,2		
	Glicose	70,2	Galactose	8,4		
			Glicose	83,0		
	EPS		(%)			
	EPS de <i>Chaetomium</i> sp.	Glicose	78,2			(ZHANG et al., 2016)
	Manose	8,9				
	Arabinose	8,6				
	Galactose	4,0				

EPS	Composição Monossacarídica								Referência
	EPSs	DGCC 7698	DGCC 7710	DGCC 7785	ST- 10255y	St-143	STCth- 9204	ST42 39	
EPS de diferentes tipos de <i>treptococcus thermophilus</i>	Glicose	20,0	50,0	25,0	25,0	50,0	50,0	25,0	(PACHEKR EPAPOL; LUCEY; GONG; NARAN; AZADI, 2017)
	Galactose	60,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	
	Ramnose	20,0	0	0	0	0	0	0	
	N-acetilglicosamina	0	0	25,0	25,0	0	0	25,0	
	EPS					(%)			
EPS de <i>Lactobacillus plantarum</i> KX041	Ramnose,					5,5			(WANG et al., 2017)
	Fucose,					0,0			
	Arabinose,					4,6			
	Xilose,					3,0			
	Manose,					0,0			
	Glicose,					3,2			
	Galactose					3,0			
Ácido galacturônico					80,4				
	LW1	(%)		LW2	(%)				
EPS de <i>Lactobacillus casei</i> SB27	Arabinose	0,11		Arabinose	5,1		(DI et al., 2017)		
	Glicose	18,1		Glicose	23,7				
	Galactose	81,7		Galactose	68,0				
	Manose	0		Manose	3,2				

**ANEXO VI - ESTUDOS REALIZADOS COM EPSs CONTENDO GLICOSE, SUAS APLICAÇÕES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Composição estrutural		Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
EPS1 Gal, Glc e Ram	(5:1:1)	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> em glicose	CG-EM/ CLAE-IR- Viscosímetro	1.7x10 <sup>6</sup> e 4.2x10 <sup>4</sup> g/mol	-	GROBEN et al., 1997.
	(11:1:0,4)					
EPS2 Gal, Glc e Ram	(3:1:4)	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> em frutose		1.3x10 <sup>6</sup> e 3.8x10 <sup>4</sup> g/mol		
	(6:1:28)					
Gal, Glc e Ram Percentuais de 83,6 – 78 Gal; 45 -12,4 Glc e 10,3 a 4,4 Ram		<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricu</i> em leite e outros	CG-EM/	-	-	PETRY et al., 2000.
Glc, Gal e Ram (5:1:1) →3)-[β-D-Galp-(1→4)]-β-D-Galp- (1→4)-[α-L-Rhap-(1→3)]-α-D- Galp-(1→2)-[β-D-Galp-(1→3)]-α- D-Galp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→		<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> leite desnatado com modificações	CPG-CLPR/ RMN	-	-	LAMOTHE; JOLLY; STINGELE, 2002.
Glc, Man, Ara, Xil, Gal, Fuc e Ram  EPS maior Glc e Man		<i>L. edodes</i> em meio com extrato de levedura, 0.1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.05% MgSO <sub>4</sub> e 0.15% CaCO <sub>3</sub>	CG-EM/ CPG-IR	1.0x10 <sup>4</sup> e 3.0x10 <sup>6</sup> g/mol	-	LO; KANG; WANG; CHANG, 2007.

Composição estrutural		Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
Glc $\beta$ -D-Glcp-(1→2,3)		O. oeni em meio contendo glicose e frutose	CGL-EM/ RMN	-	-	IBARBURU et al., 2007.
Man, Gal, Glc, Ram e Xil (58.7;21.4;3.1;3.9;2.8).		<i>A. Brasiliensis</i> em BDA com hidrolisado de proteína de soja	CG-EM	-	Redução de glicose e colesterol no sangue de ratos	LIMA et al., 2008.
Glc, Ram e Gal	(4:2:1)	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> em Leite sem proteína	CET- ELS-IR/	9x10 <sup>5</sup> g/mol (pH 6.5) 3x10 <sup>6</sup> g/mol (pH 5.5)	Aumento de viscosidade em fermentados	AYALA-HERNANDEZ et al., 2008.
Rha Gal Glu	(1.9;1.0;4.6)					
	(1.6;1.0;3.9)					
Rha Gal Glu	(1.5;1.0;3.7)	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> em Leite com proteína				
	(1.9;1.0;4.4)					
	(2.0;1.0;4.5)					
	(2.0;1.0;4.7)					
	(2.3;1.0;5.1)					
Ram, Ara, Fuc, Xil, Man, Glc e Gal (0.63:13.1:1.30:21.3:46.5:6.0:10.22)		<i>Paecilomyces cicadae</i> (Miq.) Samson ZJ001	CG-FID/ IV/ CPG	1.67x10 <sup>5</sup> g/mol	Atividade antioxidante	HE et al., 2010.

Composição estrutural		Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
Gal e Glc (1.0:0.8)		<i>S. thermophilus</i> 05-34 em leite desnatado	RMN/ IV/ CLAE-IR	2.5x10 <sup>4</sup> g/mol	Uso em iogurtes	QIN et al., 2011.
EPS1	Ara, Xil, Man, Gal, Glc (4.0;9.0;3.0;32.0;49.0) %	<i>E. cloacae strain P2B</i> Em meio tamponado de agar com glicose	CG-EM/ IV	-	Biorremediação para contaminação por metais	NAIK; PANDEY; DUBEY, 2012.
EPS2	Ara, Xil, Man, Gal e Glc (2.8;15.0;8.0;26;37) %					
Ram, Ara, Gal, Glc e Man) (0.4:0.3:1.6:0.8:1.2) →4)-α-D-Glcp-(1→4)[(1→3)-α-D-Galp]-α-Manf-(1→4)-α-D-Ram-(1→4)[(1→3)-α-D-Galp]-α-D-Manf-(1→4)-α-D-Galf-(1→		<i>B. animalis RH</i> em peptona, triptona, extrato de levedura e glicose (PTYG)	UV/ CPG/ CLAE/ CG-EM/ RMN	21.3x10 <sup>3</sup> g/mol	-	SHANG; XU; LI, 2013.
EPS 9304	Gal, Glc e Ram (68.4:15.2:6.9)	<i>O. oeni</i> e <i>L. Lactis</i> em suco de maçã e MRS	GC-EM/ CETAE	>30x10 <sup>3</sup> g/mol	-	DIMOPOULOU et al., 2014.
EPS S28	Gal, Glc e Ram (41.7:35.2:11.1)					
EPS S11	Gal, Glc e Ram (41.2:31.2:20.7)					

Composição estrutural		Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
Ba	Ram, Gal, Glc (0.72;2.67;1.0)	<i>B. cenocepacia</i> BTS2, <i>B. pyrrocinia</i> BTS7 and <i>B. cepacia</i> BTS13 em extrato de levedura e manitol	GC-EM/ RMN/CETAE	2.06x10 <sup>4</sup> a 1.43x10 <sup>7</sup> g/mol	Filmes	CUZZI et al., 2014.
Ba-r	Ram, Gal, Glc e Man (0.64;2.51;1.3;0.5)					
B-I	Ram, Gal, Glc e Man (1.43;1.84; 0.68;1.22)					
Bm-II	Ram, Gal e Man (1.43;2.0;2.2)					
B-N	Ara, Xil, Man, Gal e Glc (2.4:2.0:15.8:8.1:71.3)	<i>H. marmoreus</i> JB0 em BDA	GC-EM/ RMN/CFG	6.3 e 11x10 <sup>3</sup> g/mol	Imunomodulador	ZHANG et al., 2014.
B-N-I	Ara, Xil, Man, Gal e Glc (1.5:1.3:7.1:7.8:82.3)					
B-I	Ara, Xil, Man, Gal, Glc e GalA (4.0;0.9;68.8;12.8;12.1; 1.3)					

Composição estrutural		Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
B-I-I	Ara, Xil, Man, Gal e Glc (2.9;1.0;93.2;2.4;0.7)	<i>H. marmoreus</i> JB0 em BDA	GC-EM/ RMN/CFG	6.3 e $11 \times 10^3$ g/mol	Imunomodulador	ZHANG et al., 2014.
B-I-II	Ara, Ram, Gal, Man, Glc, GlcA; GalA (25.1;7.2;0.4;35.4;7.5;8 .6;15.8)					
B-I-III	Ara, Xil, Man, Gal, Glc, GalA (1.9;0.6;22.4;8.3;5.8;1. 1)					
B-II	Ara, Ram, Xil, Man, Gal, Glc, GlcA, GalA (10.6;12.6;5.9;6.2;17.9; 10.1;0.6;36.2)					
B-II-I	Ara, Ram, Xil, Man, Gal, Glc, GlcA, GalA (15.4;7.4;9.5;8.3;21.3;3 1.7;33.3)					
B-II-II	Ara, ram, Xil, Man, Gal, Glc, GlcA, GalA (4.3;17,8;2.0;3.6;10.9;2 0.9;1.7;38.9)					

Composição estrutural	Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
Glc, Man, Gal, Ram e Ara (3.12:1.01:1.0:0.18:0.16)  →6)-β-D-Manp-(1 → 3)-β-D-Glcp- (1 → 3)-β-D-Glcp-(1 → 3)-β-D-Glcp-(1 → 4)-α-D-Galp-(1→  Terminais de Rhap-(1→ and (1 → 4)-Arap	<i>L. helveticus</i> MB2-1 em meio com proteínas e leveduras	GC-EM/ RMN/ CET- ELS	1.83x10 <sup>5</sup> g/mol	-	LI et al., 2015.
Man, Glc e Gal (50:33:18)% (1,5:1:0,5 )	<i>P. squarrosa</i> em BDA	UV/ CPG- CLAE/ CG- FID/	3.26x10 <sup>4</sup> g/mol	Atividade antitumoral	ZHAO et al., 2015.
Fuc, Gal, Glc, Man e Ram	<i>Cianobactéria marinha</i> em meio contendo sais	IV/ CLG-EM/ CPG-IR-UV/ RMN/ ESI-EM	-	-	CHAKRABORTY ; SARKAR; SEM; PAL, 2015.
Glc, Ram e Gal (57.8, 27.7,14.5)% (2:1:0,5)  →4)-β-D-Galp-(1→3)[NAc→2]-α- L-Ramp-(1→4)[α-L-Ramp→3]-β- D-Glcp-(1→3)[NAc→2]-α-L- Ramp-(1→	<i>L. casei</i> LC2W	RMN/ IV/ CG- EM	-	-	Al et al., 2016.
Ram, Ara, Man, Glc e Gal (5,09:1:3,84:4,19:4,43)	<i>Grãos de kefir em leite desnatado</i>	CG/ IV	-	-	CHEN et al., 2016.

Composição estrutural		Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
EPS1	Gal, Glc, Ram e Man (3:1:2:0,4)	<i>S. thermophilus</i> em leite	CETAE-ELM-Viscosímetro/	$(4.05 \pm 0.79) \times 10^5$ g/mol	Produção de queijos	TIDONA, et al., 2016.
EPS2	Gal, Glc, Ram e Man (4:1:2:0,5)			$(3.92 \pm 1.53) \times 10^6$ g/mol		
Glc, Gal e Ram (2:3:2) $\rightarrow 6)-\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)[( $\alpha$ -L-Ramp-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -L-Ramp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$		<i>S. thermophilus</i> em leite	CET- ELM-IR/ CG-EM/	0.14 a $1.61 \times 10^6$ g/mol	-	PACHEKREPAPOL et al., 2017.
LW1	Ram, Fuc, Ara, Xyl, Man, Glc e Gal (1:0,6:2:0,4:1:9:17)	<i>L. casei</i> SB2 em leite	CG-EM/ IV/ CETAE-IR	25 e $1.2 \times 10^4$ g/mol	Antitumoral	DI et al., 2017.
LW2	Ram, Fuc, Ara, Xyl, Man, Glc e Gal (1:1:3:0,8:4:11:29)					
Glc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)		<i>L. pseudomesenteroides</i> XG5 em MRSm	IV/ RMN/ ATG/ CG-FID/ CETAE-IR	$2.6 \times 10^6$ g/mol	-	ZHOU et al., 2018.

Composição estrutural	Meio para obtenção	Análises Químicas	Massa Molar	Aplicações	Referências
Glc e Gal	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> Y39 e <i>S. thermophilus</i> Y102	CLAE-IR	-	-	ISPIRLI; DERTLI, 2018.
Glc	<i>L. mesenteroides</i> Y35 e <i>L. plantarum</i> Y36				
Glc, Ram e Gal (5:1:1) (66%; 18%, 16%) →3)-α-L-Rhap [(1→2)- β-D-Glcp ](1→2)-α-D-Glcp(1→3)-α-L- Rhap(1→4)[(1→3) α-D-Galp]β-L- Rhap(1→4)-β-D-Glcp(1→	<i>L. plantarum</i> TWM em meio MRSm	CG-EM/ CPG- EM/ CPG-FID/ RMN/ CETAE- ELM	2x10 <sup>6</sup> g/mol	-	PRECHTL; WEFERS; JAKOB; VOGEL, 2018.

