

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO EM ALIMENTOS E SAÚDE**

Laudelina Ferreira de Andrade

**AVALIAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO KEFIRAN: ENSAIO *in vitro* DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *Candida albicans* E MODELAGEM
MOLECULAR DAS INTERAÇÕES COM NUTRIENTES E RECEPTOR TLR-4**

Montes Claros
2025

Laudelina Ferreira de Andrade

**AVALIAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO KEFIRAN: ENSAIO *in vitro* DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *Candida albicans* E MODELAGEM
MOLECULAR DAS INTERAÇÕES COM NUTRIENTES E RECEPTOR TLR-4**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde do Instituto de Ciências Agrárias/Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Pires de Oliveira-
CMAS/ICA/UFMG

Coorientadores: Prof. Dr. Igor Viana Brandi-
CMAS/ICA/UFMG

Prof^a Dr^a Caroline Honaizer Lescano-
CMAS/ICB/UFAM

Andrade, Laudelina Ferreira de.

A553a
2025

Avaliação do exopolissacarídeo kefiran: ensaio in vitro da atividade antimicrobiana em cepas de *Candida albicans* e modelagem molecular das interações com nutrientes e receptor TLR-4 [manuscrito] / Laudelina Ferreira de Andrade. Montes Claros, 2025.
67 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Alimentos e Saúde.
Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Ivan Pires de Oliveira.

Banca examinadora: Charles Martins Aguilar, Francine Souza Alves da Fonseca,
Ivan Pires de Oliveira.

Inclui referências: f. 60-64.

1. *Candida albicans*; 2. Biotecnologia microbiana; 3. Imunologia molecular. I. Oliveira, Ivan Pires de . II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 57.08

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 05 dias do mês de fevereiro de 2025 às 14:00 horas, sob a Presidência do Prof. Ivan Pires de Oliveira, D. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Charles Martins Aguilar, D. Sc. (UFMG/ICA) e Francine Souza Alves da Fonseca, D. Sc. (UFMG/ICA), reuniu-se, presencialmente, a Banca de defesa de dissertação da Discente **Laudelina Ferreira de Andrade**, aluna do Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde. O resultado da defesa de dissertação intitulada: “**Avaliação do exopolissacarídeo kefiran: ensaio *in vitro* da atividade antimicrobiana em cepas de *Candida albicans* e modelagem molecular das interações com nutrientes e receptor TLR-4**”, sendo a aluna considerada (aprovado(a)/reprovado(a)) **_Aprovada_**. E, para constar, eu, Professor Ivan Pires de Oliveira, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências onde a candidata deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, no mínimo 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação no prazo máximo de 30 (trinta) dias.

Montes Claros, 05 de fevereiro de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **CHARLES MARTINS AGUILAR**
Data: 06/02/2025 20:18:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Charles Martins Aguilar
Membro

Documento assinado digitalmente
 **FRANCINE SOUZA ALVES DA FONSECA**
Data: 06/02/2025 10:57:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Francine Souza Alves da Fonseca
Membro

Documento assinado digitalmente
 **IVAN PIRES DE OLIVEIRA**
Data: 06/02/2025 10:20:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ivan Pires de Oliveira
Orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS/ INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Reitora: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida Vice-reitor: Prof.

Dr. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-reitor de Pesquisa: Profa. Dra. Fernando Marques dos Reis Pró-reitora de Pós-graduação: Profa. Dra. Isabela Almeida Pordeus

CURSO DE MESTRADO EM ALIMENTOS E SAÚDE

Coordenador: Prof. Dr. Igor Viana Brandi Subcoordenador: Prof. Dr.

Ivan Pires de Oliveira

Dedico **aos meus pais** Maria Ivanilde e Francisco das Chagas, que sempre batalharam para dar uma vida digna aos seus filhos. E **à minha avó**, de quem recebi o nome e tantos ensinamentos na infância, e a quem eu gostaria de contar como foram esses árduos anos. Sempre serei grata por tudo o que aprendi em sua casa, pelo carinho dos seus abraços e pelas nossas longas conversas. A senhora não lembra mais quem eu sou, mas eu nunca a esquecerei!

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta dissertação é, em poucas linhas, expressar minha gratidão a tantas pessoas que foram essenciais para que eu chegasse até aqui e concluísse esta trajetória de dois anos.

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me sustentou e continua a sustentar todos os dias. Àquele que, incontáveis vezes, ouviu minhas orações — faladas, silenciosas ou em meio a lágrimas — e jamais me desamparou. Obrigada, Senhor! Posso constatar que “a esperança não decepciona”. Sou grata, pois sei que o Senhor é bom o tempo todo e tem um propósito para tudo que nos acontece, inclusive para me trazer a Montes Claros e me fazer tão feliz.

À minha família, que, mesmo à distância, me motivou a ter coragem e a não desistir nos dias difíceis, meu profundo agradecimento. Aos meus pais, Maria Ivanilde e Francisco das Chagas, por serem os primeiros a me incentivar a crescer na vida. Aos meus irmãos, Felipe e Adelina, por sempre acreditarem em mim, me lembrarem de onde vim e do quanto já conquistei. À minha afilhada Clara, que, mesmo tão pequena, é um combustível de alegria para nossa família — sua chegada foi um dos melhores presentes para nós. Aos meus familiares paternos e maternos, famílias Ferreira e Andrade. Obrigada por tudo, amo vocês!

Minha gratidão também à família que me acolheu em Montes Claros com tanto amor e carinho. Família Souto, sou imensamente grata a cada um de vocês, minha “família mineira”.

Ao Professor Ivan, meu orientador, meu sincero agradecimento. Desde o início, demonstrou ser um profissional exemplar e um ser humano incrível. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e pela oportunidade de ser sua orientanda.

Aos professores Igor e Caroline Honaizer, meus coorientadores, pela valiosa colaboração na melhoria do meu trabalho.

Ao grupo de pesquisa SiMAp (Sistemas Moleculares Aplicados) pelo apoio, troca de conhecimentos e contribuições fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Nesta jornada, tive a felicidade de contar com a companhia de duas pessoas especiais: Daniela e Edna. Muito obrigada por estarem comigo desde o início e por me ajudarem a “remar”.

Na Universidade Federal do Maranhão, atuando no Curso de Nutrição, encontrei um grande incentivo em duas amigas que levarei para sempre no coração: Yuko e Kátia. Além de professoras competentes, em quem me espelho, foram grandes conselheiras. Obrigada!

Aos meus amigos, sou imensamente grata. Aos que ficaram em São Luís-MA e de quem

sinto saudades, aos amigos de longa data, da minha cidade natal Teresina e aos que conquistei aqui em Montes Claros Obrigada pela torcida, pelas orações e por fazerem parte da minha vida.

Expresso minha sincera gratidão aos servidores técnicos dos laboratórios da UFMG/ICA, cujo apoio foi fundamental para o desenvolvimento dos experimentos da minha pesquisa. Agradeço, em especial, aos profissionais dos laboratórios de Tecnologia de Alimentos, Biotecnologia Bloco A e CPCA, Bioprocessos, Sanidade Animal, Bromatologia, Micologia e Processos e Compostos Nutracêuticos e Funcionais. Vocês são peças essenciais dessa engrenagem.

Agradeço pela parceria com o Instituto de Pesquisa em Saúde, onde pude aprender mais sobre as atividades desenvolvidas no Biotério de Criação e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Montes Claros.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Maranhão pela oportunidade de realizar este mestrado, concedendo-me o afastamento do trabalho. Meu reconhecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA (bolsa BM-01649/23) pelo apoio financeiro e, sobretudo, pelo interesse neste estudo. Agradeço também à FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte essencial a esta pesquisa.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Meu mais profundo agradecimento é dedicado à pessoa que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis – e não foram poucos neste último ano. Que acolheu minhas lágrimas de medo, minhas crises de ansiedade e meu cansaço. Este período trouxe muitos aprendizados, e um deles foi a certeza de que eu não poderia ter alguém melhor ao meu lado. Obrigada pela paciência, pelo carinho, pela atenção e por sempre me incentivar a enxergar a vida por um novo ângulo. Que sorte a minha ter te encontrado, Robert. Amo você!

*“Aquilo que Deus quer para nós é muito mais
belo do que tudo que poderíamos pedir com a
nossa imaginação”.*

(Chiara Corbella Petrillo)

RESUMO

O kefir, um exopolissacarídeo produzido por microrganismos presentes nos grãos de kefir, tem despertado crescente interesse devido às suas propriedades bioativas e potencial aplicação biotecnológica. Este estudo teve como objetivo principal obter e caracterizar o kefir, avaliando sua atividade antimicrobiana contra dois isolados de *Candida albicans*: uma linhagem clínica da Coleção de Culturas da Micoteca do Departamento de Micologia da UFPE (URM 4986) e uma cepa de referência da American Type Culture Collection (ATCC 60193). Além disso, buscou-se investigar suas interações moleculares com nutrientes e o sistema imunológico, por meio do complexo TLR4-MD2. A extração do kefir foi realizada conforme o protocolo adaptado de Martins *et al.* (2022). Grãos de kefir foram suspensos em água destilada e aquecidos a 90°C por 1 hora, sob agitação contínua, seguido de centrifugação e precipitação em etanol. O processo de extração e purificação foi realizado ao longo de cinco dias, visando a obtenção do exopolissacarídeo em condições ideais para as análises subsequentes. A atividade antifúngica foi avaliada por meio de ensaios *in vitro*, incluindo o teste de disco-difusão e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em placas. Além dos ensaios biológicos, foram realizadas análises computacionais utilizando simulações de dinâmica molecular e docagem molecular, para investigar as interações do kefir com compostos nutricionais como vitaminas, aminoácidos, sacarídeos, triacilglicerol e o receptor TLR-4. A escolha do complexo formado pelo receptor Toll-like 4 (TLR-4) e o fator de diferenciação mielóide 2 (MD-2), baseou-se no seu papel central no sistema imunológico. Os TLRs, componentes chave da imunidade inata, são responsáveis por reconhecer padrões moleculares associados a patógenos e por modular a resposta imunológica. A configuração inicial das caixas de simulação foi gerada no software Packmol. Os sistemas foram minimizados energeticamente e submetidos a 60 ns de simulações no ensemble NPT (298,15 K e 1 atm), utilizando o campo de força CHARMM e o software NAMD. A ancoragem molecular foi utilizada para avaliar a afinidade do kefir com o complexo TLR4-MD2, explorando seu potencial imunomodulador. Os resultados confirmaram a eficiência da extração e purificação do kefir. A baixa presença de proteínas residuais na amostra evidenciou a eficácia do processo. As análises *in vitro* demonstraram que o kefir apresentou efeito fungistático contra a cepa de *Candida albicans* ATCC 60193, inibindo seu crescimento, mas sem ação fungicida, sugerindo que seu efeito antimicrobiano pode estar relacionado a mecanismos indiretos, como a modulação do sistema imunológico e da microbiota. Os resultados da modelagem molecular indicaram que o kefir interagiu com nutrientes hidrofóbicos, como triacilglicerol (trivalerato), vitamina D (colecalciferol) e isoleucina, além de demonstrar afinidade pelo lipopolissacarídeo (LPS) no sistema TLR4-MD2. Essas interações sugerem que o kefir pode modular a resposta imunológica, contribuindo para seus efeitos bioativos. Dessa forma, este estudo reforça o potencial do kefir como um composto bioativo promissor, com possíveis aplicações terapêuticas e biotecnológicas. A integração entre ensaios microbiológicos e abordagens computacionais permitiu uma

compreensão mais abrangente de suas propriedades, fornecendo bases para investigações futuras sobre suas aplicações em sistemas biológicos e na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Exopolissacarídeo; Kefiran; Modelagem Molecular, Atividade antimicrobiana; *Candida albicans*.

ABSTRACT

Kefiran, an exopolysaccharide produced by microorganisms present in kefir grains, has garnered increasing interest due to its bioactive properties and potential biotechnological applications. This study aimed to obtain and characterize kefiran, evaluating its antimicrobial activity against two isolates of *Candida albicans*: a clinical strain from the Culture Collection of the Mycotheca of the Department of Mycology at UFPE (URM 4986) and a reference strain from the American Type Culture Collection (ATCC 60193). Additionally, the study sought to investigate its molecular interactions with nutrients and the immune system through the TLR4-MD2 complex. Kefiran extraction was performed according to the adapted protocol of Martins et al. (2022). Kefir grains were suspended in distilled water and heated at 90°C for 1 hour under continuous agitation, followed by centrifugation and precipitation in ethanol. The extraction and purification process was carried out over five days to obtain the exopolysaccharide under optimal conditions for subsequent analyses. Antifungal activity was assessed through *in vitro* assays, including the disk diffusion test and determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using the microdilution method in plates. In addition to biological assays, computational analyses were performed using molecular dynamics simulations and molecular docking to investigate kefiran's interactions with nutritional compounds such as vitamins, amino acids, saccharides, triacylglycerol, and the TLR-4 receptor. The choice of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) and myeloid differentiation factor 2 (MD-2) complex was based on its central role in the immune system. TLRs, key components of innate immunity, are responsible for recognizing pathogen-associated molecular patterns and modulating the immune response. The initial configuration of the simulation boxes was generated using the Packmol software. The systems were energy-minimized and subjected to 60 ns of simulations in the NPT ensemble (298.15 K and 1 atm) using the CHARMM force field and the NAMD software. Molecular docking was employed to evaluate kefiran's affinity for the TLR4-MD2 complex, exploring its immunomodulatory potential. The results confirmed the efficiency of kefiran extraction and purification. The minimal presence of residual proteins in the sample demonstrated the effectiveness of the process. *In vitro* analyses revealed that kefiran exhibited a fungistatic effect against the *Candida albicans* ATCC 60193 strain, inhibiting its growth but without fungicidal action. This suggests that its antimicrobial effect may be related to indirect mechanisms, such as modulation of the immune system and microbiota. Molecular modeling results indicated that kefiran interacted with hydrophobic nutrients, such as triacylglycerol (trivalerate), vitamin D (cholecalciferol), and isoleucine, in addition to showing affinity for lipopolysaccharide (LPS) in the TLR4-MD2 system. These interactions suggest that kefiran may modulate immune responses, contributing to its bioactive effects. Thus, this study reinforces the potential of kefiran as a promising bioactive compound with possible therapeutic and biotechnological applications. The integration of microbiological assays with computational approaches provided a more comprehensive understanding of its properties, laying the groundwork for future investigations into its applications in biological systems and the pharmaceutical industry.

Keywords: Exopolysaccharide; Kefiran; Molecular Modeling; Antimicrobial Activity; *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da região do Cáucaso e países abrangentes, onde teve início o cultivo de Kefir	19
Figura 2. Representação de monossacarídeos comuns, divididos em hexoses e pentoses	20
Figura 3. Estrutura monomérica do kefiran contendo monossacarídeos e ligações alfa e beta-glicosídicas.....	22
Figura 4. Cultivo dos grãos de kefir. (A) grãos para inoculação; (B) grãos inoculados em leite para fermentação em 18 horas; e (C) grãos inoculados em leite para fermentação em 24 horas.....	29
Figura 5. Fluxograma do protocolo de extração e purificação do kefiran em cinco dias	31
Figura 6. Representação das etapas do protocolo de extração e purificação de kefiran. (A) aquecimento de grãos de kefir; (B) centrifugação; (C) amostras para overnight; e (D) Final do protocolo.....	32
Figura 7. Processo de liofilização. (A) KF liofilizado em placas; (B) KF para liofilização em tubos; (C) KF após liofilização em microtubos por 48 horas	33
Figura 8. Curva analítica padrão de glicose (mg/mL)	36
Figura 9. Teste de Bradford. (A) espectrofotômetro para leitura de absorbâncias; e (B) tubos com diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 e 2,0).....	37
Figura 10. Curva analítica padrão de proteína (mg/mL)	37
Figura 11. Cepas para reativação. (A) cepa URM 4986 e (B)- cepa ATCC padrão.....	38
Figura 12. Cepas após crescimento de 24h. (A) cepa URM 4986 e (B) cepa ATCC 60193...	39
Figura 13. Crescimento de microrganismo. (A) Jarras de crescimento anaeróbico e (B) crescimento em aerobiose	40
Figura 14. Representação esquemática do teste 1 de diluição em microplaca	42
Figura 15. Representação esquemática do teste 2 de diluição em microplaca	43
Figura 16. Estruturas utilizadas para simulação: (A) tetrâmero de kefiran; (B) triacilglicerol — trivalerato de glicerol; (C) monossacarídeo — D-glicose; (D) vitaminas lipossolúveis; e (E) aminoácidos	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades e aplicações do kefiran relatados na literatura	23
Tabela 2. Principais grupos de risco e medicações associados à patogênese do gênero <i>Candida</i>	26
Tabela 3. Espécies utilizadas, segundo código de identificação e origem da cepa	39
Tabela 4. Medicamentos e concentrações nos discos de antifungigrama	40
Tabela 5. Critérios de susceptibilidade aos antifúngicos testados	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
ATCC	American Type Culture Collection
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DM	Dinâmica molecular
EPS	Exopolissacarídeos
FTIR	Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
KF	Kefiran
LPS	Lipopolissacarídeo
mcg	micrograma
MD-2	Fator de diferenciação mielóide 2
mg	miligrama
mL	mililitro
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
TG	Termogravimetria
TLR4	Toll-like receptor 4
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UI	Unidade Internacional
URM	University Recife Mycologia
UV-VIS	Espectroscopia Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Kefir.....	19
2.2 Carboidratos	20
2.2.1 Polissacarídeos e exopolissacarídeos	20
2.2.2 Estrutura, Composição e Propriedades do Kefiran	21
2.2.3 Extração e Purificação do Kefiran.....	22
2.2.4 Propriedades Funcionais e Aplicações do Kefiran	23
2.3 Modelagem Molecular nos Sistemas Biológicos em estudo: nutrientes e TLR4	24
2.4 Fungo <i>Candida albicans</i> : Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de Resistência	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1 Matéria-Prima e Cultivo dos grãos de kefir	29
4.2 Extração e purificação de exopolissacarídeo de grãos de kefir.....	30
4.2.1 Protocolo para extração de Kefiran.....	30
4.2.2 Liofilização do material extraído	33
4.2.3 Rendimento do Kefiran	34
4.3 Testes de caracterização do composto kefiran.....	34
4.3.1 Teste de Molisch.....	34
4.3.2 Teste de Barfoed.....	35
4.3.3 Determinação de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico.....	35
4.3.4 Determinação do conteúdo de proteínas totais pelo método de Bradford.....	36
4.4 Linhagens fúngicas.....	37
4.4.1 Isolamento e Pureza das Cepas de <i>Candida albicans</i>	38
4.5 Crescimento de Microrganismos.....	39
4.6 Antifúngicos Testados	40
4.7 Determinação da Atividade Antifúngica.....	40
4.7.1 Método de Disco-Difusão	41
4.7.2 Método de Diluição em Microplacas para Obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	41
4.7.3 Avaliação da atividade fungicida do kefiran por meio da Concentração Fungicida Mínima	

(CFM).....	43
4.8 Abordagens computacionais para estudo das interações do kefiran.....	43
4.8.1 Simulações de Dinâmica Molecular: interação kefiran-nutriente.....	44
4.8.2 Ancoragem Molecular: ativação do sistema imunológico	45
5. PRODUTOS CIENTÍFICOS	47
5.1 Produto 1: Artigo publicado no periódico <i>Food Science and Technology</i>	47
5.2 Produto 2: Manuscrito científico para submissão.....	57
6. CONCLUSÕES GERAIS	68
7. PERSPECTIVAS	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	75
ANEXO A – Registro de publicação do Produto 1.....	75

1. INTRODUÇÃO

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros derivados de matérias-primas renováveis, como milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina e outras (NBR 15448-1, 2008). Esses materiais têm ganhado crescente destaque na indústria, principalmente devido ao seu potencial sustentável e à alta demanda por alternativas que minimizem os impactos ambientais.

Produzidos por organismos vivos, os biopolímeros são cada vez mais utilizados em diferentes setores, impulsionados por regulamentações ambientais mais rígidas e pela preferência do mercado por soluções ecologicamente responsáveis (BRITO *et al.*, 2011; CUNHA, FEITOSA *et al.*, 2009). De acordo com um estudo da Global Industry Analyst Inc. (GIA), o mercado global de biomateriais, estimado em US\$ 16,7 bilhões em 2024, deverá atingir US\$ 47,0 bilhões até 2030, evidenciando o crescente interesse e investimento nesse setor.

Dentre as diversas classes de polímeros naturais, os exopolissacarídeos (EPS) têm se destacado devido ao seu grande potencial comercial, disponibilidade e suas propriedades físico-químicas reprodutíveis (MONTEIRO *et al.*, 2021). Esses materiais são aplicados nas indústrias biomédica, farmacêutica, cosmética e alimentícia, desempenhando papéis importantes como gelificantes, espessantes, emulsificantes e estabilizantes (TAN *et al.*, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2021).

No grupo dos EPS, destaca-se um composto promissor, produzido pelos microrganismos presentes nos grãos de kefir. Esses grãos são formados por uma comunidade complexa de bactérias lácticas e leveduras, envoltas em uma matriz polissacarídica. Essa matriz, denominada kefiran, é composta principalmente por D-glucose e D-galactose e desempenha um papel essencial na proteção da microbiota dos grãos, conferindo resistência a condições ambientais adversas e favorecendo a sobrevivência dos microrganismos (DIAS *et al.*, 2018; LA RIVIÈRE; KOOIMAN, 1967).

O kefiran vem sendo investigado tanto por seu potencial sustentável quanto por suas propriedades bioativas (WANG *et al.*, 2019; BARCELOS *et al.*, 2019). No campo biotecnológico, ele se destaca principalmente por suas aplicações na engenharia de tecidos e como sistema de liberação controlada de bioativos (RADHOUANI *et al.*, 2018; BLANDÓN *et al.*, 2016). Além de sua função estrutural nos grãos de kefir, o kefiran possui propriedades funcionais com grande interesse industrial. Estudos demonstram que esse biopolímero possui efeitos benéficos à saúde, como a estimulação do sistema imunológico, ação antimicrobiana e

efeito antiaterogênico, tornando-se um composto promissor para aplicações na indústria farmacêutica (BAHARI *et al.*, 2020; MARTINS *et al.*, 2020; UCHIDA *et al.*, 2010).

Dada a crescente relevância do kefiran, compreender suas propriedades estruturais e físico-químicas é essencial para ampliar seu potencial de aplicação. Nesse contexto, abordagens computacionais, como a simulação e modelagem molecular têm se destacado como ferramentas essenciais para investigar as interações do kefiran com diversas biomoléculas. Estudos anteriores já exploraram esses aspectos, como o de Bahari *et al.* (2020), que analisaram a resposta de monócitos e linfócitos, previamente estimulados por lipopolissacarídeo (LPS), ao tratamento com kefiran, evidenciando os efeitos imunomoduladores desse exopolissacarídeo.

Outro aspecto relevante é a atividade antimicrobiana do kefiran, especialmente contra patógenos oportunistas, como as leveduras do gênero *Candida* (RODRIGUES *et al.*, 2005). Dentre essas, *Candida albicans* é uma das principais causadoras de infecções fúngicas, como a candidíase vulvovaginal, que representa um desafio à saúde pública devido à sua alta recorrência e aos efeitos adversos dos tratamentos convencionais (GIOLO *et al.*, 2010). Embora antifúngicos sistêmicos e tópicos sejam amplamente utilizados no tratamento, a crescente resistência aos medicamentos convencionais e os efeitos adversos associados impulsionam a busca por terapias alternativas e complementares (LIMA *et al.*, 2020).

Nesse contexto, compostos naturais com potencial antimicrobiano, como o kefiran, surgem como alternativas promissoras para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Assim, o objetivo principal deste estudo foi extrair, purificar e caracterizar o exopolissacarídeo kefiran obtido a partir de grãos de kefir. Além disso, investigou-se sua ação antimicrobiana frente a isolados de *Candida albicans* e avaliar suas interações com compostos nutricionais, como lipídios, monossacarídeos, vitaminas, aminoácidos e sistema imune via complexo TLR-4 MD-2, por meio de simulação e modelagem molecular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Kefir

O kefir, consumido em muitos países da Europa, Ásia Central e também no Brasil, teve sua origem nas montanhas do Cáucaso, localizada na fronteira entre a Europa Oriental e a Ásia Ocidental, abrange países como Rússia, Geórgia, Turquia, Armênia, Irã e Azerbaijão, conforme ilustrado na Figura 1. Tradicionalmente, é produzido por meio da fermentação do leite utilizando grãos de kefir como cultura inicial (OROZCO *et al.*, 2022).

Figura 1. Mapa da região do Cáucaso e países abrangentes, onde teve início o cultivo de Kefir.



Fonte: <https://iberogeorgia.com>

A palavra 'kefir' deriva do termo turco *keif*, que significa 'bem-estar'. O consumo regular desse alimento fermentado é reconhecido por seus benefícios funcionais, incluindo a promoção da saúde intestinal, o controle dos níveis de glicose sérica e colesterol, além de outros benefícios terapêuticos para a saúde (GENTRY *et al.*, 2023). Os grãos de kefir são formados a partir de um consórcio microbiano complexo, com predominância de *Lactobacillus*. Inicialmente, ocorre a autoagregação de *Lactobacillus kefirianofaciens* e *Saccharomyces* spp., formando pequenos grânulos. Posteriormente, *Lentilactobacillus kefir* fixam na superfície desses grânulos, agregando-se a outros microrganismos e componentes presentes no leite, culminando na formação dos grãos (OROZCO *et al.*, 2022).

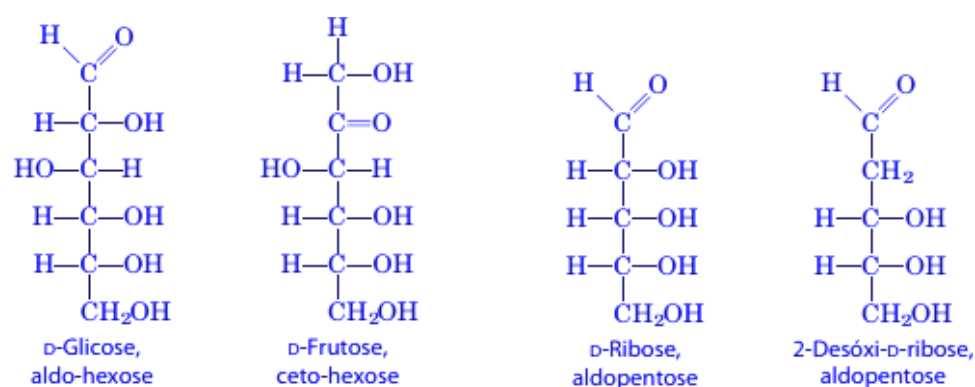
Os grãos de kefir apresentam características únicas: são macios, gelatinosos, de formato irregular, variando em tamanho de 0,3 a 3,0 cm de diâmetro. Esse consórcio microbiano é capaz

de produzir uma ampla variedade de metabólitos com efeitos promotores à saúde, incluindo a prevenção de doenças cardiovasculares, ação antioxidante, além de apresentar em sua composição compostos bioativos e microrganismos probióticos (TAN *et al.*, 2020). Além de suas funções estruturais, o kefir tem sido amplamente reconhecido por seus benefícios à saúde, sendo considerado um alimento probiótico. Os probióticos presentes no kefir são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, podem promover a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, além de fornecerem benefícios na prevenção e tratamento de diversas patologias (GUZEL *et al.*, 2011). Dentro desse contexto de substâncias com efeitos biológicos relevantes, destaca-se o kefiran, um exopolissacarídeo único presente no kefir.

2.2 Carboidratos

Os carboidratos representam as biomoléculas mais abundantes da terra e alguns deles, como o amido, são as principais fontes da dieta em muitas partes do mundo. Carboidratos são poli-hidroxi-aldeídos, poli-hidroxi-cetonas ou compostos que, ao serem hidrolisados originam essas substâncias, tendo como fórmula molecular $[C(H_2O)]_n$. Existem três grupos principais de carboidratos: monossacarídeos (Figura 2), dissacarídeos e polissacarídeos. O termo “sacarídeo” origina-se do grego sakcharon, que significa “açúcar”, razão pela qual os carboidratos são comumente conhecidos por esse nome (NELSON; COX, 2011).

Figura 2. Representação de monossacarídeos comuns, divididos em hexoses e pentoses.



Fonte: Nelson e Cox (2011).

2.2.1 Polissacarídeos e exopolissacarídeos

Polissacarídeos são macromoléculas naturais, compostas por um ou mais de 20 unidades

de monossacarídeo, podendo ter centenas ou mesmo milhares de unidades. A maior parte dos carboidratos presentes na natureza ocorre na forma de polissacarídeos, também denominados glicanos, diferenciam-se pela identidade das unidades de monossacarídeos, comprimento das cadeias, tipos de ligações e grau de ramificação (CUNHA; FEITOSA 2009; NELSON; COX, 2011).

Os microrganismos têm a capacidade de produzir e liberar polissacarídeos, conhecidos como exopolissacarídeos (EPS). Os EPS desempenham funções cruciais na proteção dos microrganismos em condições adversas. Além disso, esses compostos favorecem a adesão a superfícies sólidas e facilitam a formação de biofilmes. Os biofilmes, por sua vez, são estruturas complexas que oferecem diversos benefícios aos microrganismos, incluindo proteção contra substâncias antimicrobianas e anticorpos. Funcionando como uma barreira seletiva, tanto dentro quanto fora das células, os biofilmes contribuem para a manutenção das funções celulares. Tais características tornam os EPS objeto de grande interesse em áreas como biotecnologia, medicina e indústria alimentícia (CUNHA; FEITOSA 2009; TAN *et al.*, 2020; SHANKAR *et al.*, 2021; BARCELOS *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019).

Entre os exopolissacarídeos com aplicações industriais destacam-se: xantana, gelana, dextrana, alginato, dentre outros. A estrutura desses polissacarídeos varia consideravelmente. Por exemplo, a dextrana é um homopolissacarídeo composto por moléculas de glicose, já a gelana é um heteropolissacarídeo formado por ácido glucurônico, glicose e ramnose, contendo também grupos acetato e glicerato em sua composição (CUNHA; FEITOSA 2009).

2.2.2 Estrutura, Composição e Propriedades do kefiran

Em 1967, La Rivière e colaboradores isolaram pela primeira vez um exopolissacarídeo, posteriormente denominado "kefiran", a partir dos grãos de kefir. Os grãos de kefir consistem em um consórcio de microrganismos imersos em uma matriz de polissacarídeo, o kefiran. Esse biopolímero, originado dos microrganismos presentes nos grãos, é composto por proporções quase iguais de D-glucose e D-galactose. A caracterização inicial do kefiran revelou uma massa molecular variável, dependendo da fonte de carbono utilizada, o que é comparável à variação observada em outros polissacarídeos naturais, como o amido e a quitosana (TAN *et al.*, 2020).

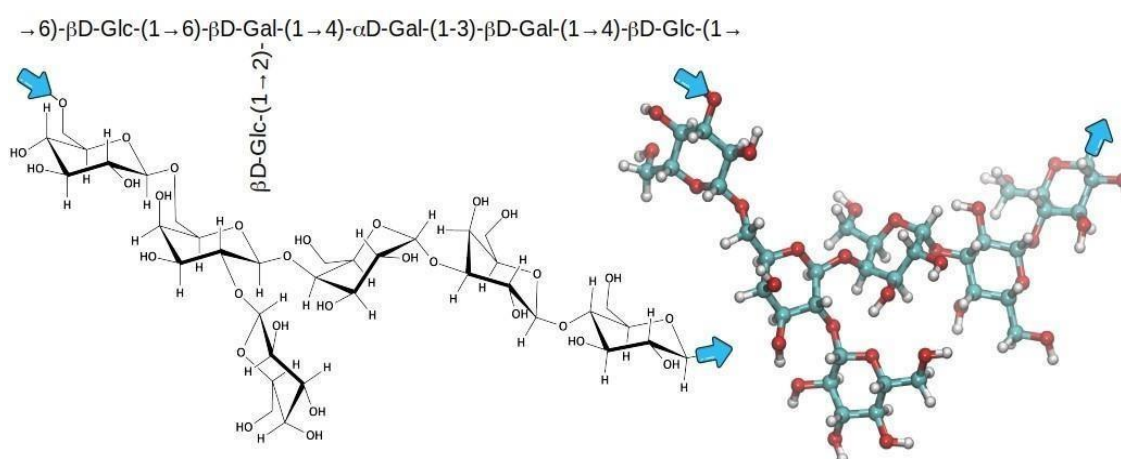
O exopolissacarídeo kefiran é secretado por diversas bactérias do ácido láctico do gênero *Lactobacillus*, incluindo *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Uma de suas principais funções é proteger a microbiota dos grãos de kefir em condições

ambientais adversas, sendo responsável por cerca de 24 a 25% do peso seco do grão (GENTRY *et al.*, 2023; OROZCO *et al.*, 2022; MARTINS *et al.*, 2022).

A estrutura do kefiran foi descrita por Kooiman (1968) após estudos de metilação, que forneceram evidências substanciais para associar as estruturas à kefirose e kefiran. A estrutura principal do kefiran é composta por glicose e galactose, como ilustrado na Figura 3, com uma ramificação ligada ao O-2 de resíduos de galactose e terminando em resíduos de glicose (GENTRY *et al.*, 2023).

Assim como outros EPS de interesse industrial, o kefiran possui propriedades estruturais e funcionais relevantes. Além de seu papel na matriz dos grãos de kefir, ele vem sendo investigado devido ao seu potencial sustentável e bioativo, com aplicações promissoras também em biotecnologia e na indústria farmacêutica. (RADHOUANI *et al.*, 2018; BLANDÓN *et al.*, 2016; BAHARI *et al.*, 2020).

Figura 3. Estrutura monomérica do kefiran contendo monossacarídeos e ligações alfa e beta-glicosídicas.



Fonte: Adaptado de (Micheli *et al.*, 1999)

2.2.3 Extração e purificação do kefiran

A obtenção do kefiran purificado é realizada a partir da extração dos grãos de kefir. O método de extração e purificação foi descrito em estudos anteriores e envolve principalmente a dissolução dos grãos de kefir em água quente, seguida pela centrifugação para remoção de detritos microbianos e pela precipitação do kefiran em etanol a baixas temperaturas. Após a precipitação, o kefiran é submetido à centrifugação a frio e posteriormente redissolvido em água quente. A extração em escala industrial é difícil e de baixo rendimento (MORADI; KALANPOUR, 2019; MICHELI *et al.*, 1999).

Inúmeros protocolos para a extração de kefiran estão descritos na literatura e foram aprimorados ao longo dos anos. Esses estudos destacam variações nos processos de aquecimento e precipitação, além de evidenciar que o composto extraído pode apresentar diferenças significativas dependendo do protocolo utilizado (MARTINS *et al.*, 2022).

No protocolo descrito por MARTINS *et al.* (2022), foram testados três métodos distintos para a extração e purificação do kefiran, com o objetivo de determinar o mais eficiente entre eles. As variações entre os protocolos envolveram diferenças no tempo de aquecimento, temperatura e na aplicação de agitação contínua ou descontínua. A avaliação dessas variáveis é fundamental para otimizar a extração do kefiran, garantindo maior rendimento e pureza do polissacarídeo, características essenciais para seu uso em aplicações alimentícias, farmacêuticas e biotecnológicas.

2.2.4 Propriedades Funcionais e Aplicações do kefiran

O kefiran continua a ser objeto de interesse devido ao seu status *Generally Recognized as Safe* (GRAS), importante indicador de segurança para aditivos alimentares, bem como suas características reológicas e propriedades benéficas para a saúde, incluindo suas ações antibacterianas, antifúngicas e antitumorais. Além disso, discute-se a aplicação do kefiran, especialmente para a entrega de medicamentos biofarmacêuticos e outras aplicações biomédicas (TAN *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, devido às características do kefiran, uma variedade de aplicações em diferentes áreas tem sido relatada (MORADI; KALANPOUR, 2019). Sua aplicação tem se expandido também na indústria de alimentos, especialmente devido às suas propriedades de texturização, conferindo consistência e estabilidade a diversos alimentos (PIERMARIA *et al.*, 2011). O kefiran apresenta propriedades funcionais e aplicações em diferentes áreas, como descrito na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Propriedades e aplicações do kefiran relatados na literatura.

PROPRIEDADES	Referência
Estimulação do sistema imunológico	BAHARI <i>et al.</i> , 2020
Formação de filme	PIERMARIA <i>et al.</i> , 2011
Efeito antiaterogênico	UCHIDA <i>et al.</i> , 2010

Engenharia de tecidos	RADHOUANI <i>et al.</i> , 2018
Redução da pressão arterial e glicemia	MAEDA <i>et al.</i> , 2004
Redução dos níveis de colesterol	
Atividade antimicrobiana	MARTINS <i>et al.</i> , 2022
Ação cicatrizante e antiinflamatória	ROGRIGUES <i>et al.</i> , 2005
Capacidade de transportar materiais	BLANDÓN <i>et al.</i> , 2016

Fonte: Autor

As possibilidades de aplicação do kefiran, especialmente nos campos médico e biológico, evidencia seu potencial. Atualmente, ele é visto como uma alternativa inovadora para novos avanços e descobertas em diversas áreas (MORADI; KALANPOUR, 2019). Em sistemas biológicos, o kefiran já foi avaliado; no entanto, compreender suas interações em nível molecular ainda representa um grande desafio.

2.3 Modelagem Molecular nos Sistemas Biológicos em estudo: nutrientes e TLR4

A Simulação de Dinâmica Molecular (DM) é uma abordagem computacional versátil para a análise de macromoléculas biológicas. Baseada na Mecânica Clássica, permite investigar a evolução temporal de um sistema de partículas, fornecendo uma compreensão detalhada do comportamento microscópico e dinâmico dos átomos que constituem esse sistema (NAMBA *et al.*, 2008).

Para a execução da DM, é fundamental definir não apenas as posições e velocidades iniciais das partículas, mas também as forças que atuam sobre elas. Essas interações são descritas por um conjunto abrangente de potenciais denominado "campo de força". O manejo das interações intermoleculares requer a implementação de um modelo ou campo de força eficaz, que possibilite a realização de cálculos em larga escala em proteínas, membranas ou outros sistemas biológicos. As simulações de DM têm sido amplamente empregadas para explorar a estrutura e a função de biomoléculas e seus complexos numa dependência temporal, bem como para analisar as interações proteína-ligante (NAMBA *et al.*, 2008; ALONSO *et al.*; 2006).

Visando minimizar os custos computacionais, estudos sobre alterações conformacionais no ligante ou no sítio de ligação podem ser conduzidos por meio de docagem molecular,

facilitando a seleção de possíveis candidatos a fármacos ou explicando o efeito de um ligante em uma região específica do receptor. A ancoragem molecular, também conhecida como atracamento ou docagem, é uma abordagem *in silico* fundamental, pois permite prever os modos de interação entre micromoléculas ou macromoléculas e um sítio receptor (NAMBA *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2022). Esse método tem sido aplicado em investigações sobre interações interação entre o fármaco e seu alvo biológico. Um exemplo é o estudo de Siqueira e Martínez (2019), que avaliaram a inibição da biossíntese de esterol mediada pelo fluconazol, utilizando simulações moleculares para analisar interações de ligantes em sistemas biológicos.

Neste contexto, de maneira semelhante ao estudo de Bahari *et al.* (2020), testamos o kefiran em sistemas imunológicos, especificamente nas vias de sinalização mediadas pelo LPS. Esse componente, presente na membrana externa de bactérias gram-negativas, é capaz de desencadear respostas inflamatórias no organismo. Para a análise, utilizamos o complexo formado pelo receptor Toll-like 4 (TLR4) e o fator de diferenciação mielóide 2 (MD-2), uma proteína adaptadora que se liga diretamente ao TLR4 e desempenha um papel essencial no reconhecimento do LPS, associado aos nutrientes de interesse. Como parte do sistema de defesa do organismo, os TLRs desempenham um papel essencial na imunidade inata, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos e modulando a resposta imunológica (FERRAZI *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2009).

Em outro estudo semelhante, Park *et al.* (2009) determinaram a estrutura cristalina do complexo TLR4–MD-2–LPS, revelando que o LPS interage com um grande bolsão hidrofóbico da MD-2. No estudo, os pesquisadores usaram o LPS de *Escherichia coli* para entender como o complexo TLR4–MD-2 o reconhece e desencadeia uma resposta imune. Um exemplo de aplicação de modelagem molecular ao sistema de interesse é a compreensão das interações moleculares em sistemas biológicos, com destaque para a investigação de vias de sinalização imunológica mediadas pelo LPS, reconhecido como um indutor potente de receptores de reconhecimento padrão, especialmente o TLR4 (BAHARI *et al.*, 2020).

As moléculas associadas ao TLR4 e suas vias de sinalização estão expressas em células do sistema imunológico. Atuando como um agonista primário do TLR4, o LPS induz uma superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, exacerbando respostas inflamatórias. Essa característica faz do LPS um alvo estratégico para estudos terapêuticos e para o desenvolvimento de moduladores imunológicos. O estudo de Bahari *et al.* (2020) indicou que tratamentos com kefiran, ao modular a expressão gênica dessas vias, podem atenuar respostas inflamatórias, destacando seu potencial como modulador imunológico. Esse aspecto é particularmente relevante para doenças causadas por agentes etiológicos resistentes, como a

candidíase.

2.4 Fungo *Candida albicans*- Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência

Os fungos são classificados como organismos eucariontes desprovidos de clorofila, que obtêm energia a partir da absorção de matéria orgânica, sendo classificados como heterotróficos, podendo apresentar estrutura unicelular ou multicelular e requerem condições específicas para seu crescimento e desenvolvimento, incluindo uma fonte contínua de oxigênio, água, material orgânico e temperatura adequada. Sua parede celular é rígida e pode conter celulose, glicanas, mananas ou quitina, enquanto sua membrana celular possui esteróis. O glicogênio é a principal substância de reserva desses organismos (VIEIRA; QUEIROZ, 2012; SILVA *et al.*, 2016)

Entre os fungos leveduriformes que causam infecções oportunistas em humanos, destacam-se as espécies do gênero *Candida*, a mais prevalente associada a esse grupo é a espécie *Candida albicans*. O gênero *Candida* foi reconhecido como patógeno humano pela primeira vez em 1839, quando Bernhard von Langenbeck isolou a espécie *albicans* de uma infecção oral em paciente com tifo. Estudos indicam que o gênero *Candida* ocupa a terceira posição entre as principais causas de septicemia no mundo. No Brasil, *Candida* foi identificado como o sétimo agente etiológico mais frequente em infecções sanguíneas, com *C. albicans* sendo a espécie mais prevalente, responsável por 34,3% dos casos (ROCHA *et al.*, 2021).

Rocha *et al.* (2021) destacaram que estudos anteriores já relataram a diversidade de espécies do gênero *Candida*, muitas das quais podem colonizar o trato gastrointestinal, o sistema geniturinário, a pele e as mucosas do trato respiratório em seres humanos. Em determinadas situações, essas espécies podem adquirir caráter patogênico, conforme descrito na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2. Principais grupos de risco e medicações associados à patogênese do gênero *Candida*.

Grupos de risco	Pacientes imunocomprometidos
	Pacientes em nutrição parenteral
	Pacientes hospitalizados
	Pacientes com catéteres
	Pacientes transplantados

	Idosos
	Grávidas
	Diabéticos
Medicamentos	Antibióticos
	Corticosteróides
	Anticoncepcionais

Fonte: Autor

Os principais problemas associados à espécie *Candida albicans* incluem a alta incidência de infecções em adultos, acompanhada de elevada mortalidade. Esse cenário agrava-se pelo aumento da resistência dos microrganismos aos antifúngicos de referência, com destaque para as classes dos azólicos e das equinocandinas. O uso crescente dessas drogas antifúngicas tem levado a um aumento significativo nos relatos de resistência a esses medicamentos, evidenciando a necessidade de compreender os mecanismos envolvidos nesse processo (ROCHA et al., 2021; VIEIRA; SANTOS, 2016).

Diante desse contexto, a infecção fúngica causada pelo gênero *Candida*, conhecida como candidíase, pode se manifestar de forma superficial, acometendo pele, cabelos, unhas e membranas mucosas, ou evoluir para infecções invasivas que atingem órgãos profundos e a corrente sanguínea. A candidíase oral é mais comum em idosos que utilizam próteses dentárias e fumantes, enquanto a candidíase vulvovaginal afeta aproximadamente 50% das mulheres, muitas vezes com episódios recorrentes, além de poder ocorrer em recém-nascidos (ROCHA et al., 2021).

A capacidade de *Candida albicans* em estabelecer infecções está diretamente associada aos seus mecanismos de resistência. Entre seus principais fatores de virulência, destacam-se a capacidade de adesão, a habilidade de alternar entre diferentes formas morfológicas (polimorfismo), a variabilidade fenotípica e a produção de enzimas extracelulares e toxinas. Esses mecanismos favorecem a colonização do hospedeiro e contribuem para o desenvolvimento da infecção (SANTANA et al., 2013).

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo principal obter e caracterizar o exopolissacarídeo kefiran, isolado a partir de grãos de kefir, e avaliar seus efeitos sobre cepas de *Candida albicans*, com ênfase em seu potencial antimicrobiano. Além disso, investigou-se as interações do kefiran com compostos nutricionais, incluindo lipídios, monossacarídeos, vitaminas, aminoácidos e sistema imune via complexo TLR4 MD-2.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair, purificar e realizar a caracterização química do exopolissacarídeo kefiran;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do exopolissacarídeo contra cepas de *Candida albicans*;
- Investigar as interações do kefiran com compostos nutricionais como lipídeos, monossacarídeos, vitaminas, aminoácidos e sistema imune via complexo TLR4 MD-2 utilizando simulações de dinâmica molecular e docagem molecular.

4- METODOLOGIA

4.1- Matéria-prima e cultivo dos grãos do kefir

Para a obtenção do kefir foram utilizados grãos doados pelo Laboratório de Tecnologia dos Alimentos da UFMG, onde ocorreu o cultivo. O meio de fermentação utilizado foi leite de vaca UHT (3% de gordura) da marca Porto Alegre S/A, produzido em Ponte Nova/MG, Brasil, e adquirido no comércio local de Montes Claros/MG. Os grãos de kefir utilizados neste estudo, inicialmente doados em estado congelado, foram ativados por meio de sucessivas fermentações em leite de vaca integral a 25°C, com trocas diárias do substrato, até atingirem estabilidade na fermentação. Durante esse período, os grãos foram cultivados diariamente por algumas semanas, sendo lavados e pesados a cada troca de meio para monitorar o crescimento. Após esse processo, a inoculação dos grãos de kefir foi realizada em triplicata, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4. Cultivo dos grãos de kefir. (A) grãos para inoculação; (B) grãos inoculados em leite para fermentação em 18 horas; e (C) grãos inoculados em leite para fermentação em 24 horas.



Fonte: Autor

Os grãos de kefir foram peneirados e lavados com água destilada antes de serem inoculados em leite de vaca integral UHT. As fermentações foram realizadas utilizando-se 10% (m/v) de grãos de kefir em 100 mL de leite, acondicionados em frascos de vidro fechados de forma não hermética. Os ensaios para esse cultivo inicial foram realizados com tempos de fermentação variando entre 18 e 24 horas, sob temperatura controlada de 25°C.

4.2 Extração e purificação de exopolissacarídeo de grãos de kefir

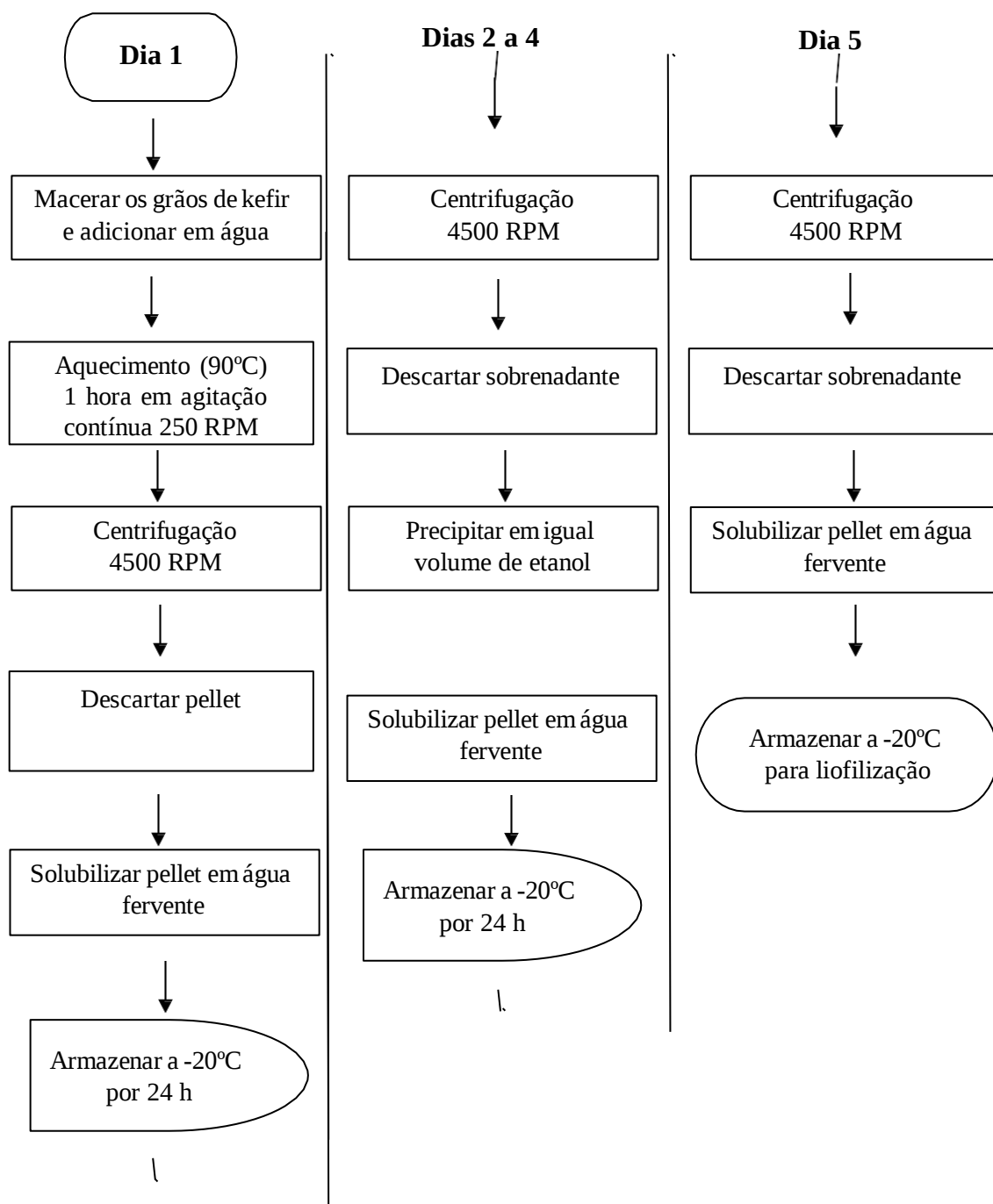
A extração do exopolissacarídeo foi realizada com base em adaptações do protocolo descrito por Martins *et al.* (2022), que avaliaram três protocolos distintos para padronizar o processo de extração de kefiran. O primeiro protocolo utilizou fervura por 3 horas em agitação contínua, enquanto o segundo manteve a fervura por 30 minutos com agitação constante. O terceiro protocolo envolveu a fervura por 30 minutos, também com agitação, porém em lote. Cada um desses procedimentos foi desenvolvido para testar diferentes condições de tempo e agitação, com o objetivo de otimizar a extração do kefiran. O protocolo que apresentou a melhor atividade biológica foi o primeiro, que demonstrou promissores resultados antimicrobianos.

Considerando esses achados e os objetivos deste estudo, que incluem avaliar os efeitos do kefiran sobre o fungo *Candida albicans*, nosso protocolo de extração foi realizado com base em adaptações das metodologias descritas por Martins *et al.* (2022).

4.2.1 Protocolo para extração de kefiran

O protocolo de extração e purificação do kefiran foi executado no Laboratório de Bioprocessos e no Laboratório de Processos e Compostos Nutracêuticos e Funcionais da UFMG. O processo iniciou-se com o aquecimento da amostra, no qual (10 g) de grãos de kefir foram adicionados a (100 mL) de água destilada, estabelecendo uma proporção de 1:10 (m/v) entre soluto e solvente. A mistura foi aquecida a 90°C por 1 hora, com agitação contínua. Em seguida, o líquido resultante foi transferido para tubos e submetido à centrifugação a 4500 rotações por minuto (RPM), dando continuidade ao procedimento, conforme descrito na Figura 5, que apresenta um fluxograma detalhado do protocolo.

Figura 5. Fluxograma do protocolo de extração e purificação do kefiran em cinco dias



Legenda:

- ✓ **Pellet:** Substância sólida que se forma no fundo do tubo após centrifugação, composta por células e resíduos.
- ✓ **Sobrenadante:** Líquido que fica acima do pellet, na parte superior do tubo, contendo as substâncias solúveis, como o kefiran extraído.

Figura 6. Representação das etapas do protocolo de extração e purificação de kefiran. (A) aquecimento de grãos de kefir; (B) centrifugação; (C) amostras para overnight; e (D) Final do protocolo.



Fonte: Autor

Inicialmente, os grãos foram macerados e, em seguida, misturados com o volume de água ultrapura. A mistura foi transferida para um erlenmeyer vedado para evitar a perda de líquido durante o aquecimento, especialmente quando a água atingiu altas temperaturas. Para garantir a agitação, adiciona-se uma barra magnética ao recipiente. A Figura 6 ilustra o processo de extração e purificação do kefiran por meio das etapas do protocolo: Figura 6 (A) aquecimento em agitação contínua dos grãos de kefir para o início do processo de extração do kefiran, realizado em chapa de aquecimento (Diagtech). A temperatura (90°C) do sistema foi monitorada por meio de um termômetro do tipo espeto, imerso em um volume de água contido em um béquer, assegurando maior precisão no controle térmico.

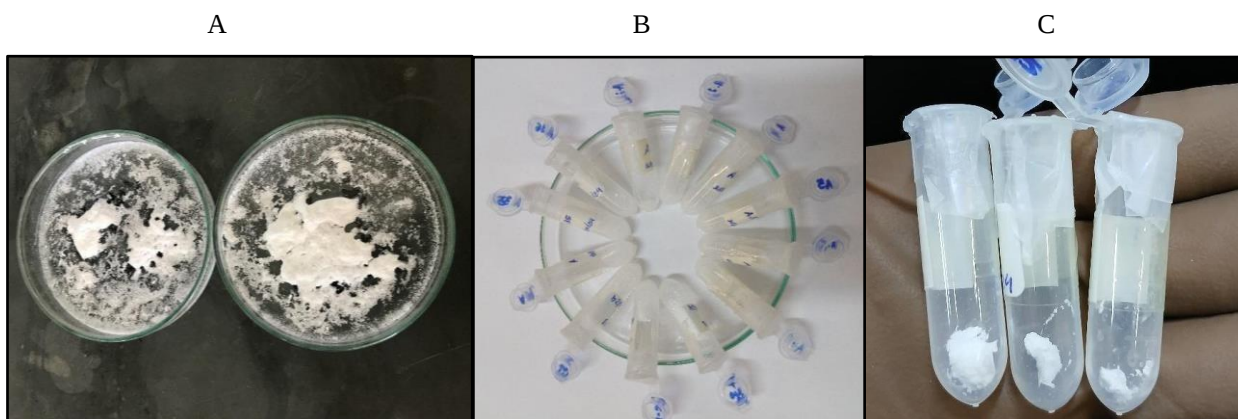
Finalizado o tempo de aquecimento previsto de 1 hora, o erlenmeyer com o líquido foi retirado da chapa de aquecimento e deixado para resfriar à temperatura ambiente antes de dar continuidade ao protocolo. Em seguida, o líquido resultante foi transferido para microtubos, os microtubos foram devidamente identificados e submetidos à centrifugação Figura 6(B) a 4500 RPM por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, as etapas subsequentes foram realizadas conforme especificado para cada dia no protocolo experimental, de acordo

com o protocolo descrito na Figura 6. Depois da última centrifugação Figura 6(D) as amostras foram solubilizadas em água ultrapura fervente e os microtubos armazenados a -20°C para posterior liofilização.

4.2.2 Liofilização do material extraído

O material foi liofilizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias da UFMG. A Figura 7 apresenta o KF liofilizado por 48 horas. Inicialmente, a liofilização foi realizada em placas de Petri, enquanto na segunda etapa o processo ocorreu diretamente em microtubos. Essa abordagem foi adotada para otimizar as análises subsequentes, que requeriam menores quantidades de material.

Figura 7. Processo de liofilização. (A) KF liofilizado em placas; (B) KF para liofilização em tubos; e (C) KF após liofilização em microtubos por 48 horas.



Fonte: Autor

A utilização de microtubos possibilitou a obtenção de quantidades reduzidas de material, além de reduzir a manipulação, o que minimizou possíveis perdas durante o procedimento. Essa abordagem garantiu que o material fosse acondicionado de forma adequada nos microtubos, facilitando o envio e as etapas subsequentes de análise.

4.2.3 Rendimento do kefiran

Os rendimentos finais da extração de kefiran foram calculados pela razão da massa inicial e final do processo, após a liofilização, conforme Equação 2.

$$R(\%) = m_f / m_i * 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde:

R(%) = rendimento percentual

m_f = massa final

m_i = massa inicial

4.3 Testes de caracterização do composto kefiran

Os testes de caracterização do EPS foram realizados no Laboratório de Bromatologia do bloco C e Laboratório de Biotecnologia do bloco A da UFMG.

4.3.1 Teste de Molisch

Hans Molisch (1856-1937), botânico checo-austríaco, foi o criador do teste de Molisch, um teste químico sensível para a presença de carboidratos. Este teste baseia-se na reação dos carboidratos com ácido sulfúrico concentrado, que desidrata o açúcar e promove a formação de um aldeído, como furfural ou hidroximetilfurfural. Esse aldeído reage com o alfa-naftol (ou outro reagente utilizado) formando um composto roxo ou lilás, que indica a presença de carboidratos na amostra analisada (SANTOS, 2005).

O Teste de Molisch foi utilizado para confirmar a presença de carboidratos na amostra de kefiran. Para isso, foi preparada uma solução contendo (0,05g) de KF dissolvidos em (5 mL) de água destilada, previamente aquecida por 2 minutos. A mesma concentração foi empregada na solução padrão de glicose, utilizada como referência. Os tubos de ensaio foram preparados com as seguintes soluções: glicose (controle positivo), a amostra de KF e água destilada (controle negativo). Em cada tubo, contendo (1 mL) da respectiva solução, foram adicionadas 2 gotas do reagente de Molisch (α -naftol), seguido de agitação suave. Em seguida, foi cuidadosamente pipetado (1 mL) de ácido sulfúrico concentrado em cada tubo, inclinando-o para que o ácido escorresse pelas paredes (adaptado de QUEIROZ, 2007 ; NELSON; COX, 2011).

4.3.2 Teste de Barfoed

Thomsen Barfoed foi um químico dinamarquês que, na década de 1870, desenvolveu o reagente de Barfoed, uma solução de acetato cúprico e ácido acético. Este reagente é utilizado para detectar a presença de monossacarídeos em amostras. A reação química ocorre quando os monossacarídeos reduzem os íons cúpricos (Cu^{2+}) presentes no reagente a íons cúpricos (Cu^+), formando um precipitado de óxido de cobre (I) vermelho. Esse precipitado indica a presença de monossacarídeos na amostra analisada (COELHO, 2024).

No laboratório, o reagente de Barfoed foi preparado combinando uma solução de acetato com ácido acético. Paralelamente, o KF foi preparado dissolvendo-se (0,05g) do composto em (5 mL) de água destilada. Para otimizar a solubilização, a mistura foi agitada em um agitador Kline por 5 minutos, a uma velocidade de 120 rpm. Após o aquecimento, a solução foi novamente submetida ao agitador Kline por 5 minutos, mantendo a velocidade de 120 rpm. Com as soluções preparadas, 1 mL da solução de amostra foi transferido para um tubo de ensaio, seguido pela adição de 3 mL do reagente de Barfoed. O tubo foi aquecido em banho-maria, e o tempo necessário de 1 a 2 minutos para a formação de um precipitado vermelho foi registrado (adaptado de QUEIROZ, 2007 ; NELSON; COX, 2011).

4.3.3 Determinação de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico

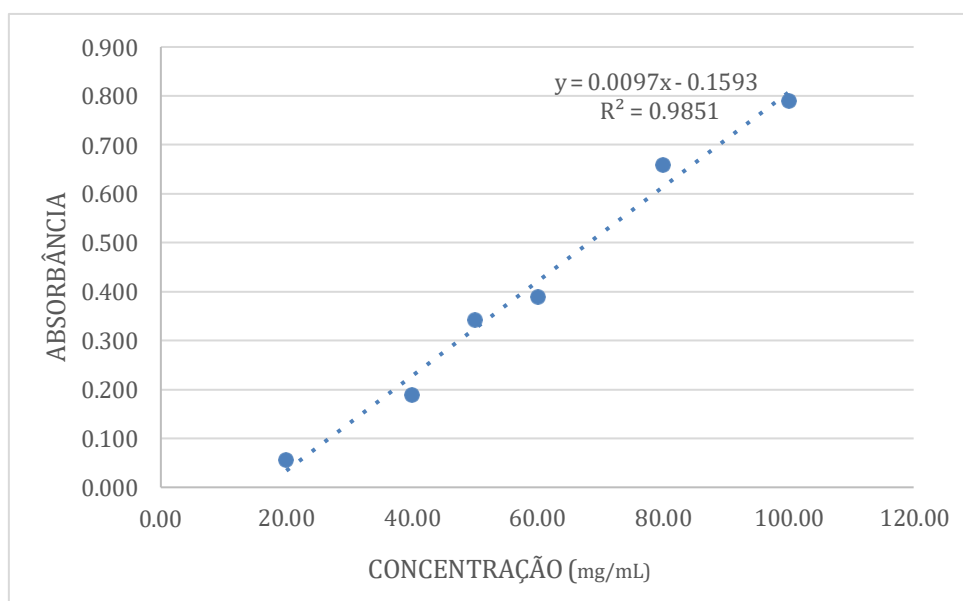
O método fenol-sulfúrico é utilizado para a determinação de açúcares totais é reconhecido como um dos métodos colorimétricos mais rápidos e de fácil execução (NIELSEN, 1998). A reação baseia-se na desidratação dos açúcares, promovida pela adição de ácido sulfúrico, que gera produtos intermediários como furfural ou hidroximetilfurfural. Esses produtos, ao reagirem com o fenol, formam um complexo amarelo-alaranjado.

A intensidade dessa coloração é diretamente proporcional à concentração de açúcares presentes na amostra. Para quantificar os açúcares, o complexo formado é lido em espectrofotômetro a 490 nm. A reação química e a absorbância medida fornecem uma estimativa da quantidade de açúcares totais na amostra. O método foi adaptado de Dubois *et al.* (1956), que utilizaram soluções padrão de glicose para calibração e análise.

Para esse teste preparou-se uma solução padrão de glicose (D-glicose) nas concentrações de 20, 40, 50, 60, 80 e 100 mg/mL (Figura 8). Foram preparados 0,5 mL das amostras em 0,5 mL de água destilada, após isso foi adicionado 0,5 mL de fenol e os tubos foram agitados vigorosamente com o auxílio de vórtex. Após a agitação, adicionou-se

rapidamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado pelas paredes dos frascos e o conteúdo foi agitado novamente. Após esperar 10 minutos, fez-se a leitura em espectrofotômetro (NOVA 1600 UV) medida na região do espectro visível a 490 nm. O cálculo das quantidades de açúcar total foi realizado através de uma curva analítica obtida com auxílio do Microsoft *Excel*®.

Figura 8. Curva analítica padrão de glicose (mg/mL).

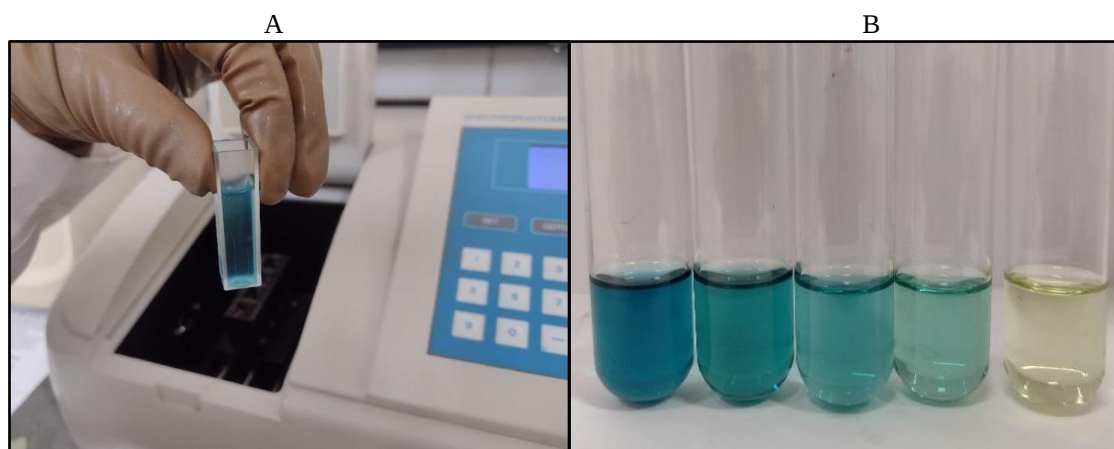


Fonte: Autor

4.3.4 Determinação do conteúdo de proteínas totais pelo método de Bradford

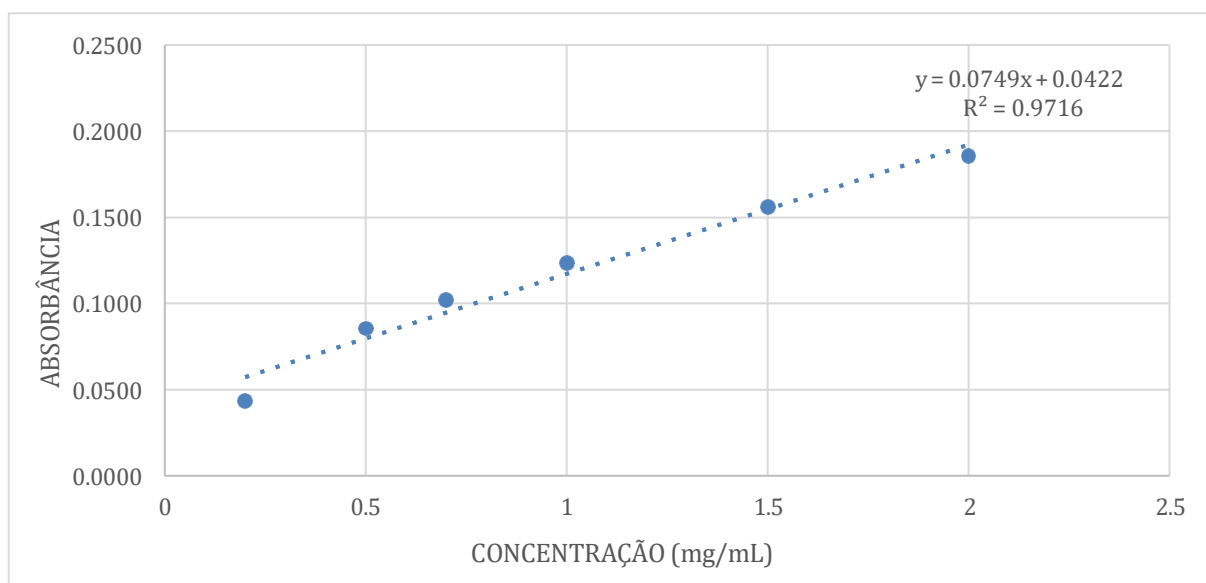
O método de Bradford foi utilizado para a determinação de proteínas totais na amostra de kefir. Nesse método, a proteína presente na amostra se liga ao corante Coomassie Brilliant Blue G-250, formando um complexo azul estável. Esse complexo apresenta máxima absorbância a 595 nm, e a intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra. Para a construção da curva padrão de proteínas considerou-se as concentrações de 0,1 a 2 mg/mL nos tubos e 2 mL de reagente de Bradford. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (NOVA 1600 UV), conforme descrito na Figura 9. A calibração do equipamento para o valor da absorbância (ABS) zero foi realizada utilizando-se água destilada como branco na cubeta e a leitura foi feita em comprimento de ondas de 595 nm. O cálculo das quantidades de proteínas foi realizado através de uma curva analítica obtida com auxílio do Microsoft *Excel*®.

Figura 9. Teste de Bradford. (A) espectrofotômetro para leitura de absorbâncias; e (B) tubos com diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 e 2,0).



Fonte: Autor

Figura 10. Curva analítica padrão de proteína (mg/mL).



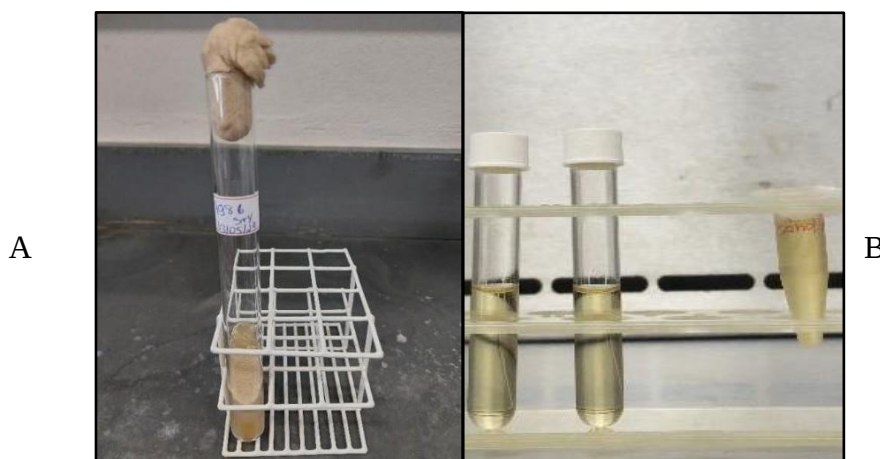
Fonte: Autor

4.4 Linhagens fúngicas

Neste estudo utilizou-se linhagens clínicas de fungos pertencentes à Coleção de Culturas Micoteca do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE e cepa de referência da American Type Culture Collection (ATCC) doada

pelo Laboratório de Ecologia Microbiana da UFMG. A Figura 11 mostra como as cepas foram recebidas.

Figura 11. Cepas para reativação. (A) cepa URM 4986 e (B) cepa ATCC padrão.



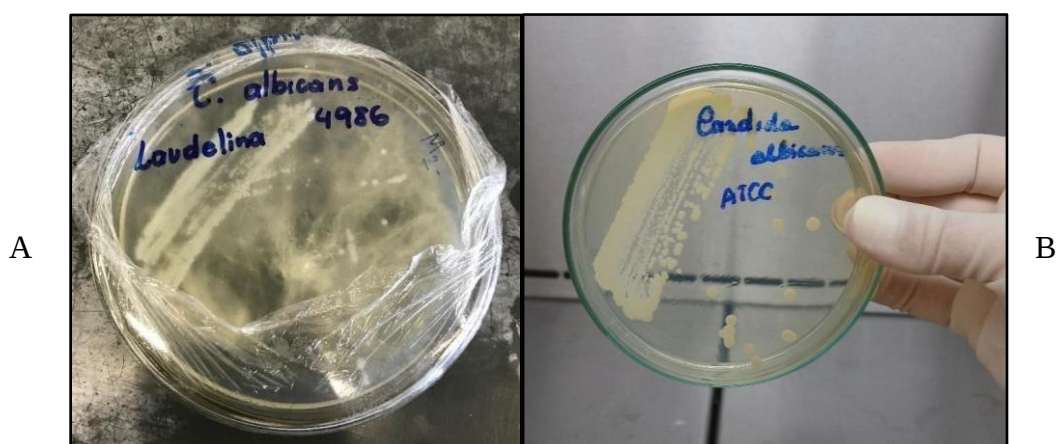
Fonte: Autor

4.4.1 Isolamento e pureza das cepas de *Candida albicans*

A cepa padrão de *Candida albicans* URM 4986, adquirida do banco de cepas da UFPE, foi enviada em tubo de ensaio. Após o recebimento, realizou-se um experimento no Laboratório de Sanidade Animal, no qual a cepa foi semeada em placas de Petri por esgotamento em estrias. O objetivo do experimento foi avaliar o potencial de crescimento e a pureza da cepa, por meio da observação da formação de colônias nas placas.

Para o procedimento de repique da cultura para meio sólido em placa, o meio de cultura vertido nas placas foi o Ágar batata dextrose (BDA), amplamente usado para o cultivo de fungos. Estriou-se a alça bacteriológica sobre o meio de cultura em três estrias, inicialmente estria-se em metade da placa, com movimentos de zig-zag. Quando se atinge a metade, gira-se a placa 90° e estria até a metade, equivalente a 1/4 da placa, gira-se mais 90° e estria-se o meio restante. As placas foram armazenadas em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, passadas as horas verificou-se que houve crescimento de colônias (Figura 12), o que permitiu o repique da cepa em outros tubos de ensaio e/ou placas, para utilização nas demais análises necessárias.

Figura 12. Cepas após crescimento de 24h. (A) cepa URM 4986 e (B) cepa ATCC 60193.



Fonte: Autor

As cepas utilizadas no estudo foram descritas de acordo com a sua espécie, código e origem de isolamento, conforme Tabela 3:

Tabela 3. Espécies utilizadas, segundo código de identificação e origem da cepa.

Espécie	Código	Origem de isolamento
<i>Candida albicans</i>	Cepa de referência ATCC* 60193	Colo do útero
<i>Candida albicans</i>	Cepa URM* 4986	Secreção vaginal

Fonte: Autor

*ATCC: American Type Culture Collection. URM: University Recife Mycologia

4.5 Crescimento de microrganismos

O crescimento de bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias ácido acéticas e leveduras do kefir foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do bloco A da UFMG, utilizando diferentes meios. As BAL foram crescidas em meio MRS broth De Man, Rogosa e Sharpe (Germany), plaqueamento em diluições decimais adequadas (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). As bactérias do ácido láctico em meio GY (50g/L de glicose, 10g/L de extrato de levedura, 20 g/L de ágar).

As leveduras foram crescidas em meio YPG (10g/L de extrato de leveduras, 10g/L de peptona, 20g/L de glicose e 20g/L de ágar) acrescido de cloranfenicol na concentração de 100 mg/L, plaqueamento em diluições (10^{-2} e 10^{-3}).

As placas foram incubadas em condições de anaerobiose para bactérias, em jaras

anaeróbicas PVC (Permutation), a 35°C por 24 horas e aerobiose para leveduras por 72 h a 28°C, de acordo com a Figura 13.

Figura 13. Crescimento de microrganismo. (A) Jarras de crescimento anaeróbico e (B) crescimento em aerobiose.



Fonte: Autor

O teste de crescimento foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade dos grãos de kefir e garantir um desenvolvimento adequado de colônias, essencial para as análises subsequentes. Essa etapa foi necessária, pois os grãos estavam congelados e precisaram ser reativados para o estudo.

4.6 Antifúngicos testados

Para os testes de atividade antifúngica foram utilizados discos para antifungigrama de tamanho médio de 6,35mm (Cecon), contendo medicamentos de referência, em concentrações já descritas na literatura, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Medicamentos e concentrações nos discos de antifungigrama.

Medicamento	Concentração
Fluconazol	25 mcg
Nistatina	100 U.I

Fonte: Autor

4.7 Determinação da atividade antifúngica

Os testes para determinação da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal da UFMG.

4.7.1 Método de disco-difusão

O teste de disco-difusão foi realizado em meio de cultura Mueller-Hinton Agar (KASVI). As placas foram incubadas em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e o inóculo foi preparado usando-se colônias suspensas em 4,0 mL de solução salina esterilizada. A turbidez da suspensão foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland.

As cepas foram inoculadas nas placas contendo o meio de cultura com o auxílio de uma alça de inoculação, em seguida foram adicionados os discos de antifúngicos. A leitura das placas foi realizada visualmente, e após o período de 24h de incubação, foram medidos os halos formados em torno dos discos de antifúngicos e expressos em milímetros (mm).

A definição dos parâmetros de resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade foram definidos seguindo os critérios do fornecedor Cecon, detalhes na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios de susceptibilidade aos antifúngicos testados.

Suscetibilidade	Antifúngico testado/ Halo de inibição (mm)	
	Fluconazol	Nistatina
Sensível	>19	>10
Intermediário	14 a 19	-
Resistente	<14	≤10 mm

Fonte: Autor

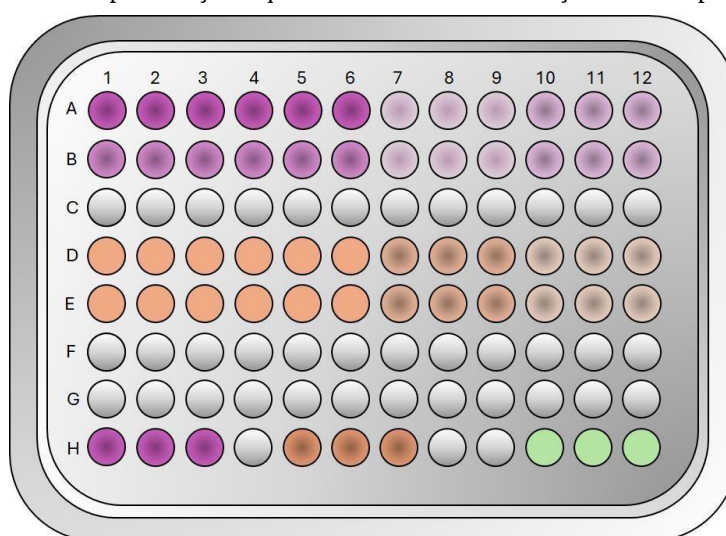
4.7.2 Método de diluição em microplacas para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada utilizando-se a técnica de diluição em microplacas, segundo a Norma M27-A2 *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com modificações. Os poços das microplacas foram preenchidos com 160µL do caldo Sabouraud + composto kefiran, em diluições seriadas nas concentrações de 150 mg/mL, 70 mg/mL e 37 mg/mL. Em seguida foram acrescentados 20 µL das suspensões das cepas de *Candida albicans* em cada orifício da microplaca, exceto nos poços referentes ao controle negativo, onde acrescenta-se apenas o caldo Sabouraud, conforme ilustrado na Figura 14 (Representação esquemática do teste de diluição em microplaca).

Posteriormente, as microplacas foram incubadas em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, com os testes realizados em triplicata. Após esse período, as microplacas foram retiradas da estufa e adicionou-se 20 μL de Cloreto de Trifenil Tetrazólio P.A. (TTC) (Dinâmica) a cada poço, aguardando cerca de 30 minutos para o desenvolvimento da reação. O TTC é um sal de tetrazólio que, na presença de células metabólicas ativas, sofre redução e forma um composto insolúvel vermelho, o formazan, o que resulta na coloração avermelhada observada nos poços. Nos poços onde ocorreu a formação de complexo avermelhado, interpretou-se que houve crescimento do microrganismo, ou seja, o composto adicionado não foi capaz de inibir as cepas estudadas.

Nos poços de controle positivo, onde não houve a adição de composto antimicrobiano, espera-se a formação da cor avermelhada, indicando o crescimento do microrganismo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do composto capaz de impedir a mudança de cor, ou seja, que inibiu o crescimento visível do microrganismo.

Figura 14. Representação esquemática do teste 1 de diluição em microplaca.



Fonte: Autor

A- Cepa URM 4986

B- Cepa URM 4986

Nos poços de 1 a 6 foram utilizadas concentrações de 150 mg/mL

Nos poços de 7 a 9 foram utilizadas concentrações de 70 mg/mL

Nos poços de 1 a 6 foram utilizadas concentrações de 37 mg/mL

D- Cepa ATCC 60193

E- Cepa ATCC 60193

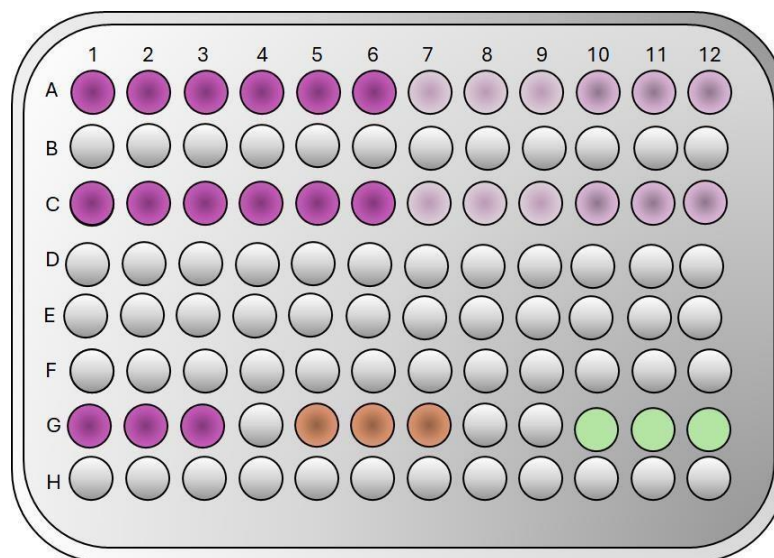
H- Controle positivo da cepa URM 4986 nos poços de 1 a 3

Controle positivo da cepa ATCC 60193 nos poços de 5 a 7

Controle negativo nos poços de 10 a 12

No segundo teste realizado (Figura 15), estabeleceu-se o mesmo protocolo descrito acima, com modificações apenas referente aos tratamentos. No primeiro teste foram analisados dois tratamentos diferentes para cada uma das cepas, no segundo teste considerou-se as mesmas cepas URM 4986 e ATCC 60193 mas apenas um tratamento. Outra modificação foram as concentrações, onde para o segundo teste definiu-se concentrações de 400, 200 e 100 mg.

Figura 15. Representação esquemática do teste 2 de diluição em microplaca.



Fonte: Autor

A- Cepa URM 4986

C- Cepa ATCC 60193

Nos poços de 1 a 6 foram utilizadas concentrações de 400 mg/mL

Nos poços de 7 a 9 foram utilizadas concentrações de 200 mg/mL

Nos poços de 1 a 6 foram utilizadas concentrações de 100 mg/mL

G- Controle positivo da cepa URM 4986 nos poços de 1 a 3

Controle positivo da cepa ATCC 60193 nos poços de 4 a 6

Controle negativo nos poços de 10 a 12

4.7.3 Avaliação da atividade fungicida do kefir por meio da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A menor concentração do kefir que demonstrou efeito sobre a cepa foi submetida a retrocultivo em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud. As placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, visando confirmar a atividade fungicida do composto.

4.8 Abordagens computacionais para estudo das interações do kefir

As análises computacionais deste estudo foram conduzidas com métodos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa SiMAp (Sistemas Moleculares Aplicados), utilizando simulações de dinâmica molecular e ancoragem molecular para investigar as interações do kefiran. As simulações avaliaram a estabilidade do kefiran com nutrientes, enquanto a ancoragem molecular investigou suas interações com alvos imunológicos, auxiliando na compreensão de seus efeitos bioativos.

4.8.1 Simulações de Dinâmica Molecular: interação kefiran-nutriente

A Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica eficiente para avaliar interações intra e intermoleculares, permitindo a análise de interações de curto e longo alcance e a compreensão do comportamento atômico ao longo do tempo. Essa abordagem é amplamente utilizada para investigar proteínas, macromoléculas e sistemas em solução (Borges *et al.*, 2023; Lescano *et al.*, 2021; Oliveira & Caires, 2019). Para a realização das simulações, diferentes campos de força e programas podem ser empregados, sendo essencial a escolha adequada para garantir a acurácia dos resultados.

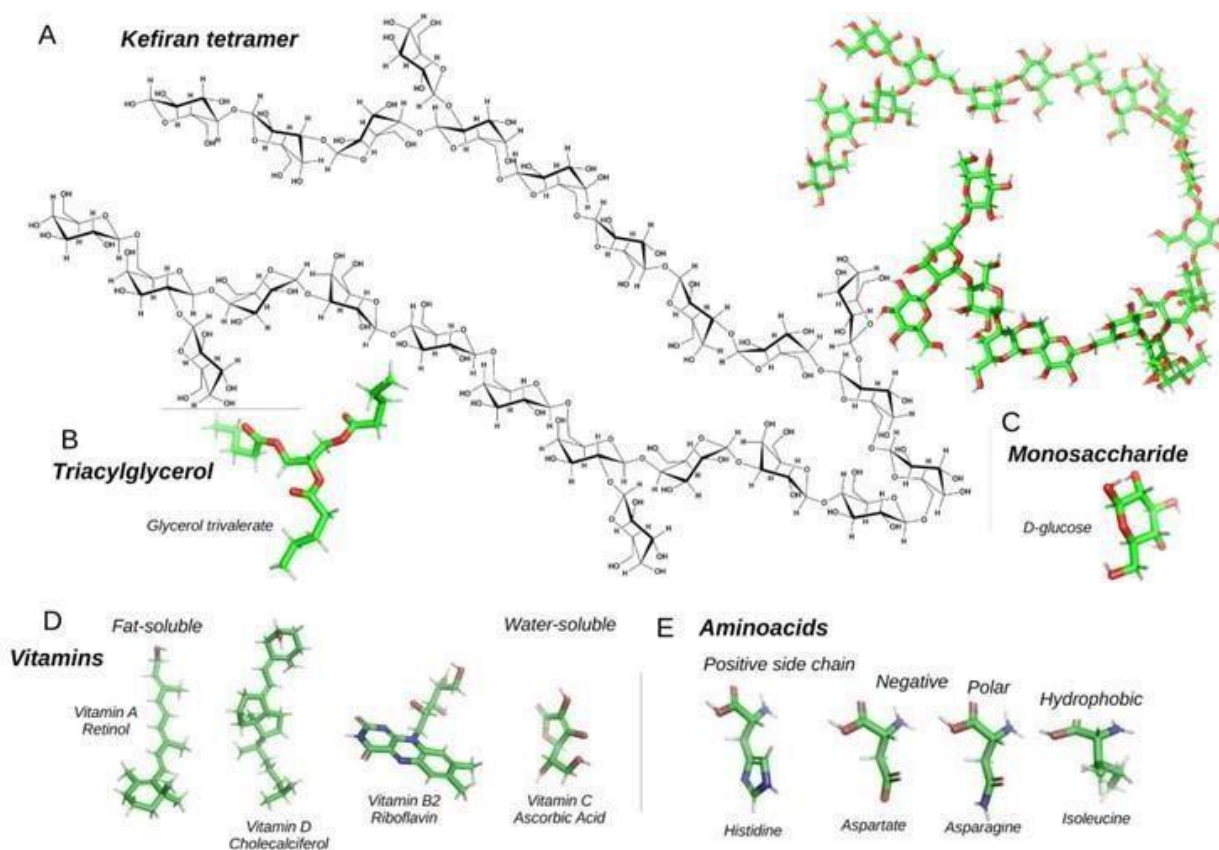
Neste estudo, a interação entre o kefiran e os nutrientes foi analisada por meio de dois sistemas distintos, conforme ilustrado na Figura 16: (i) um sistema contendo um tetrâmero de kefiran solvatado em água e (ii) um sistema composto pelo mesmo tetrâmero, porém na presença de nutrientes, incluindo vitaminas, aminoácidos, sacarídeos e triacilgliceróis, com vinte moléculas de cada composto.

As configurações iniciais das caixas de simulação foram geradas utilizando o software Packmol (Martínez *et al.*, 2009), garantindo uma distribuição inicial aleatória e não sobreposta das moléculas. Para garantir a estabilidade dos sistemas, foi realizada uma etapa de minimização de energia com 10.000 ciclos do método do gradiente conjugado (CG). Em seguida, cada sistema foi submetido a 60 ns de simulações de DM, utilizando o ensemble NPT (número de partículas, pressão e temperatura constantes) a 298,15 K e 1 atm. A pressão foi controlada por um barostato Langevin, com um período de 200 fs, decaimento de 100 fs e temperatura de pistão de 293,15 K. A temperatura do sistema foi mantida estável por meio de um termostato de Langevin.

Todas as moléculas envolvidas foram parametrizadas utilizando o campo de força Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM) (Nau, 2000), garantindo a fidelidade da modelagem molecular. As simulações foram conduzidas com o software NAMD (Nelson, 1995), enquanto a análise e visualização dos dados foram realizadas com os programas

VMD, PyMOL e MDAnalysis (Humphrey et al., 1996).

Figura 16. Estruturas utilizadas para simulação: (A) tetrâmero de kefiran; (B) triacilglicerol — trivalerato de glicerol; (C) monossacarídeo — D-glucose; (D) vitaminas lipossolúveis; e (E) aminoácidos.



Fonte: Autor

4.8.2 Ancoragem Molecular: ativação do sistema imunológico

Estudos recentes sugerem que o kefiran pode desempenhar um papel importante na modulação da resposta imunológica e na ativação de mecanismos anti-inflamatórios. Em particular, a interação do kefiran com os receptores Toll-like (TLRs), especialmente o TLR4, tem sido investigada como um possível mecanismo para os benefícios imunológicos associados ao composto, como relatado por Bahari *et al.* (2020). Para investigar essas interações, foi realizada uma simulação de ancoragem molecular, onde uma unidade monomérica de kefiran foi encaixada no sítio catalítico do receptor TLR4.

A ancoragem molecular foi conduzida utilizando o programa DockThor (de Magalhães *et al.*, 2014), que permite a previsão da posição e da orientação de moléculas ligantes no sítio ativo de proteínas receptoras. A estrutura cristalina do TLR4 complexada com MD-2 foi obtida

a partir do Protein Data Bank (PDB ID: 3FXI; Park *et al.*, 2009b). Para realizar o estudo, foi escolhida uma das subunidades do heteropolímero para investigar as energias de ligações ligante-receptor no domínio do sítio de ligação.

O sistema foi configurado em uma caixa de grade cúbica com dimensões de 30 Å x 30 Å x 30 Å (Δx , Δy e Δz), e a coordenada do centro da caixa foi definida como $(x, y, z) = (26,0200, -10,3150, 13,5680)$ em relação às coordenadas do receptor. A discretização da energia foi definida como 0,31 Å, o que permitiu uma análise precisa da interação entre o ligante (kefiran) e o receptor TLR4. Para a simulação, foram adotados os parâmetros padrão da plataforma DockThor.

Após a realização da ancoragem, as diferentes conformações geradas para a interação entre o kefiran e o receptor TLR4 foram agrupadas com base no desvio quadrático médio (*RMSD – Root Mean Square Deviation*), considerando um valor máximo de até 2 Å. Este critério de agrupamento permitiu selecionar as melhores conformações possíveis, representando as interações mais favoráveis entre o kefiran e o TLR4.

5. PRODUTOS CIENTÍFICOS

5.1 Produto 1: Artigo publicado no periódico *Food Science and Technology*

Aplicação Prática

Um conjunto de propriedades moleculares é apresentado e discutido para o exopolissacarídeo de kefiran. Este bioativo possui estrutura complexa, sendo aqui modelado como o monômero e tetrâmero composto por ligações glicosídicas D-glicose e D-galactose. Assim, as interações kefiran-nutrientes podem ajudar a explicar as propriedades experimentais - físicas, químicas e biológicas- deste biopolímero, conforme explorado aqui como um ativador do sistema imunológico via receptor *Toll-like 4*.

Título

Molecular analysis of Kefiran exopolysaccharide: Interactions with vitamins, amino acids, monosaccharides, lipids, and Toll-like receptor 4

DOI: <https://doi.org/10.5327/fst.00393>

Molecular analysis of Kefiran exopolysaccharide: Interactions with vitamins, amino acids, monosaccharides, lipids, and Toll-like receptor 4

Laudelina Ferreira de ANDRADE^{1,2} , Rebeca Santana da COSTA¹ , Melissa Biazzi FILA¹ , Daniela Cácia dos SANTOS¹ , Tamirys Caroline Silva SOUZA¹ , Charles Martins AGUILAR¹ , Sérgio Henrique Sousa SANTOS¹ , Igor Viana BRANDI¹ , Caroline Honaiser LESCANO^{1,3} , Ivan Pires de OLIVEIRA^{1*} 

Abstract

Kefir grains are composed of a consortium of microorganisms, which are enveloped in a matrix of exopolysaccharides called kefiran, with an almost equal proportion of D-glucose and D-galactose, produced by lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus*. Associated with a diversity of proteins and lipids, kefiran supports the symbiotic cellular structure and protects it against external influences, such as nutrient deficiencies, dehydration, bacteriophages, toxicity, and osmosis. Kefiran has attracted the attention of the scientific community due to its functional properties, and its role in modulating the immune system is the most studied and has potential for exploration. However, the biopolymer has a complex molecular structure and its physical and chemical properties still require investigation. The present study addresses the interaction between the kefiran tetramer and various compounds: trivalerate triacylglycerol; monosaccharide — D-glucose; fat-soluble vitamins such as vitamin A — retinol and vitamin D — cholecalciferol; water-soluble vitamins such as vitamin B2 — riboflavin and vitamin C — ascorbic acid; and amino acids such as positive side chain histidine, negative aspartate, polar asparagine, and hydrophobic isoleucine. From its molecular properties and experimental results from the literature, we discuss the role of kefiran in acting similarly to the carbohydrate portion of lipopolysaccharides in the Toll-like receptor and myeloid differentiation factor 2 system, activating the immune system.

Keywords: kefir; kefiran; exopolysaccharide; nutrients; molecular dynamics; TL receptors.

Practical Application: A set of molecular properties is presented and discussed for kefiran exopolysaccharide. This bioactive has a complex structure, being modeled here as the monomer and tetramer of D-glucose and D-galactose glycosidic bonds. Thus, the kefiran–nutrient interactions can assist in explaining the experimental — physical, chemical, and biological — properties of this biopolymer, as explored here as an activator of the immune system via Toll-like receptor 4.

1 INTRODUCTION

1.1 Kefir system: Fermented milk, grains, and health benefits

The kefir drink originates from the Caucasian Mountains, the extreme southeast of Europe between the Caspian Sea and the Black Sea, with the word “kefir” originating from the Turkish term “keif,” which means “well-being”. It is estimated that the cultivation of this drink began around 2000 BC, being widely spread among generations of people and tribes in that region (Rosa et al., 2017). Currently, it is known that this drink has been produced and consumed on all continents, given its functional potential as a fermented food product, traditionally made through the fermentation of milk with kefir grains (González-Orozco et al., 2022), being the subject of study in recent years.

The fermented product is composed of bacteria and yeasts that proliferate in a microbial association forming a macrostructure called “kefir grains,” such grains are made up of lactose fermenting and non-fermenting yeasts (Ibáñez-Quiróga et al., 2022). In short, for the formation of grains, the self-aggregation of *Lactobacillus kefirianofaciens* and *Saccharomyces* spp. initially occurs, forming small granules. Then, the *Lentilactobacillus kefir* attach themselves to the surface of the granules, aggregating with other organisms and components present in the milk, generating the visually characteristic macrostructure. Due to the fermentation process of releasing lactic acid and acetic acid, resulting from the bioconversion of lactose, the drink has an acidic flavor (González-Orozco et al., 2022); the cultivation of microorganisms can be done using water and sugar, or milk, and is considered a probiotic food (Abraham & De Antoni, 1999). Given the beneficial properties for health reported in

Received: Aug. 30, 2024.

Accepted: Oct. 1, 2024.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Sistemas Moleculares Aplicados, Montes Claros, MG, Brazil.

²Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Luís, MA, Brazil.

³Universidade Federal do Amazonas, Institute of Biological Sciences, Manaus, AM, Brazil.

*Corresponding author: ivan.pires.oliveira@gmail.com

Conflict of interest: nothing to declare.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (grants 29628/APQ-01868-22, 31347/APQ-05670-23, and APQ-00727-23), FUNDEP/UFMG/PRPq grants 30201, and 30563, Fundação de desenvolvimento da pesquisa/Universidade Federal de Minas Gerais/Pró-reitoria de Pesquisa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, BM-01649/23.

the literature, and through empiricism, the food industry has proposed and marketed a series of products based on this fermented drink, which include yogurts, creamy cheeses, açai pulp, protein ice creams, and associations with jellies, among others (Sperotto et al., 2017; Zottmann da Silva & Weschenfelder, 2020). Its consumption has become popular all over the world, and for this reason, it has been called the “yogurt of the 21st century” (Gentry et al., 2023).

The other important component in this kefir system, the grains, have unique characteristics, such as softness, gelatinous appearance, and irregular shape, ranging in size from 0.3 to 3.0 cm in diameter. The complex microbial consortium present in kefir grains can produce a variety of metabolites and differs from other fermented products as they comprise a specific and complex mixture of bacteria that produce lactic acid, acetic acid, and various bioactive compounds, in addition to lactose-fermenting and non-lactose-fermenting yeasts, which coexist in symbiotic association (Ganatsios et al., 2021; Rosa et al., 2017). As well as the liquid component of the drink, grains are also known to have health-promoting effects, including benefits in reducing cholesterol levels, preventing cardiovascular disease, and antioxidant action (Tan et al., 2020).

Through the milk fermentation process, several compounds are produced that give kefir its characteristic aroma and flavor. Many of these compounds have nutraceutical properties that, together with a balanced diet, generate benefits such as increased growth of bifidobacteria and lactobacilli in the intestinal microbiota, stimulation of the immune system, antimicrobial activity against pathogens, and possible antitumor actions (Ahmed et al., 2013). Regular intake of this product is recognized for promoting intestinal health, controlling serum glucose and cholesterol levels, as well as offering other benefits given its probiotic nature (da Silva & Okura, 2021; Gomes et al., 2020). These benefits are associated with microorganisms preserving the probiotic function, as well as the activities of exopolysaccharides (EPSs) and the peptides produced during the fermentation process. Furthermore, regular and constant intake of kefir has been linked to improved digestion and lactose tolerance, antibacterial effects, hypocholesterolemic effects, control of plasma glucose, antihypertensive effects, anti-inflammatory effects, and antioxidant activity, as well as anticancer, antiallergic, and healing properties, among others (Rosa et al., 2017).

1.2 The exopolysaccharide kefiran: Structure and health benefits

Exopolysaccharides are biopolymers secreted by bacteria and fungi, natural components of their habitat, and can be obtained from plant, animal, or microbial sources. Microbial EPSs perform vital ecological and physiological functions, acting to protect microorganisms in adverse environments, in addition to promoting adhesion to solid surfaces, and facilitating the formation of biofilms (Tan et al., 2020). These biofilms are complex structures that provide a series of advantages to microorganisms, such as protection against antimicrobial substances and antibodies, in addition to serving as a selective barrier to the diffusion of nutrients into and out of the cell, contributing to cellular function. These properties make EPS targets of interest in several areas, including biotechnology, medicine, and the food industry (Barcelos et al., 2020; Shankar et al., 2021; Wang et al., 2019).

In 1967, Rivière et al. first isolated an unknown EPS called “kefiran” from kefir grains, which was classified as a food biopolymer. Initial characterization of kefiran revealed that this natural polymer has a molecular mass range of 1.0×10^4 – 6.6×10^6 Da, depending on the carbon source used. This molecular weight range is comparable to other natural polysaccharides, such as starch and chitosan, for example. In general, kefiran is a water-soluble microbial EPS composed of glucose and galactose, formed by monomers linked by O-glycosidic bonds, and can be classified as heteropolysaccharides due to the set and diversity of monosaccharides in its structure (Barcelos et al., 2020; Wang et al., 2019), being suggested by Kooiman et al. in 1968, after methylation studies and oxidation analysis, and being corroborated by Mukai et al. in 1987 and 1990 (Mukai et al., 1990; 孝夫向井 et al., 1988). In the late 1990s, Micheli et al. (1999) proposed a defined structure for each monomeric unit composed of six hexoses, with the ratio maintained at 1:1 between glucose and galactose, in beta-glycosidic bonds for the most part, as shown in Figure 1.

The main structure of the polysaccharide is composed of D-glucose and D-galactose, with a D-glucose branch. The majority composition of beta-glycosidic bonds prevents hydrolysis by digestive enzymes in the human gastrointestinal tract; however, kefiran can be fermented by bacteria (Gentry et al., 2023). It is suggested that, through the association between a variety of proteins and lipids, kefiran supports the symbiotic cellular structure, protecting it from external influences, preventing nutrient deficiencies, dehydration effects, bacteriophage actions, chemical toxicity, and osmosis. In this sense, kefiran has been directly associated with the bioavailability of nutrients, enhancing the nutritional aspects of foods.

Furthermore, the literature has shown that kefiran has antimicrobial, healing, antibacterial, antitumor, antioxidant, anti-inflammatory, and biocidal properties, and some capacity to modulate the intestinal immune system, in addition to effects on reducing blood pressure. The functional properties associated with this biopolymer, such as stimulation of the immune system and antimutagenic activity, have aroused interest in the scientific community. Studies have shown the effects of kefiran on lipids, blood pressure, and blood glucose levels, where significant inhibition of blood pressure (Gentry et al., 2023), reduction of blood cholesterol levels, and reduction of blood glucose levels were observed. Another important and described role of kefiran is in immunomodulation. Kefiran is capable of inducing the expression of IL-10, an inhibitory cytokine in inflammatory processes, and increasing the phagocytic activity of dendritic cells. In addition, it appears to prevent the increase in the levels of inflammatory mediators induced by lipopolysaccharide (LPS) in monocytes. This immunomodulatory role was also observed in the lamina propria of the large intestine of animals treated with kefiran, where the levels of IgA+, IgG+, IL-4+, IL-10+, IL-6+, and TNF + increased during the 7 days of treatment (Vinderola et al., 2006).

Due to its versatility, the application of kefiran for the delivery of biopharmaceutical drugs and other biomedical applications is also being discussed. These results suggest that the kefiran biopolymer has the potential to act as a functional food

or in formulations with therapeutic applicability. Considering the extensive discussion in the literature about the versatility of kefir in biological and biotechnological applications, in addition to its pharmacological effects, this work presents a molecular description of the interaction of this EPS with nutrients — vitamins, amino acids, sugar, and lipids using molecular dynamics simulations. A discussion of its immunological effects from a molecular point of view is also presented.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Molecular dynamic simulations: Kefiran–nutrient interactions

This is a powerful technique for evaluating molecular interactions (intra and inter), computing short/long-range interactions, and understanding how atoms interact over time, especially used for proteins, macromolecules, and solution systems (Borges et al., 2023; Lescano et al., 2021; Oliveira & Caires, 2019). Different force fields and programs can be used to perform the molecular dynamics (MD) simulations as they have potential energy functions similar to those presented in Equation 1. In this equation, V_{total} is the sum of intramolecular (bonded) and intermolecular (non-bonded) potentials, such as covalent bonds, angles formed by three adjacent atoms covalently bound, dihedral torsion to a set of four atoms, Lennard–Jones potentials for pairs of atoms interacting by van der Waals forces, and electrostatic potential, which describes the interactions between charged particles:

$$V_{\text{total}} = \frac{1}{2} \sum_{\text{bonds}} k_b (r - r_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{dihedrals}} k_\phi [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{\text{pairs}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_{\text{pairs}} \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \sum_{\text{pairs}} \frac{B}{r_{ij}^6} \quad (1)$$

To calculate the interactions between kefir and nutrients, two systems were built according to structures presented in Figure 2: System i consists of the kefir tetramer in water, whereas system ii includes the kefir tetramer with nutrients — vitamins, amino acids, saccharides, and triacylglycerol, containing twenty molecules of each. The initial configurations of simulation boxes were built using Packmol (Martínez et al., 2009). All systems containing the kefir tetramer, with and without nutrients, were equilibrated by performing 10,000 steps of Conjugate Gradient (CG) minimization followed by 60 ns of MD simulations. Production runs were performed for each system in the NPT (number of particles, pressure, and temperature constants) ensemble at 1 atm and 298.15 K. The pressure was controlled using a Langevin barostat with a period of 200 fs, 100 fs decay, and a piston temperature of 293.15 K. A constant temperature was maintained using a Langevin bath with a 10 ps^{−1} damping coefficient. The Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM) force field was used for all molecules (Nauss, 2000). Simulations were performed using the NAMD program (Nelson, 1995), and figures/analyses were produced using VMD, Pymol, and MDAnalysis programs (Humphrey et al., 1996).

2.2 Molecular docking: Immune system activation

Studies have associated kefir with improving anti-inflammatory response and immune system activation. The interactions with Toll-like receptors (TLR) are a reliable behavior reported to the kefir mechanism for immunological benefits as previously suggested (Bahari et al., 2020). The recognition of diverse LPS molecules by the TLR-4 and myeloid differentiation factor 2, MD-2, heterodimer (Park et al., 2009a) suggests possible interactions with the polysaccharide kefir. In this sense, molecular docking calculus was performed to evaluate

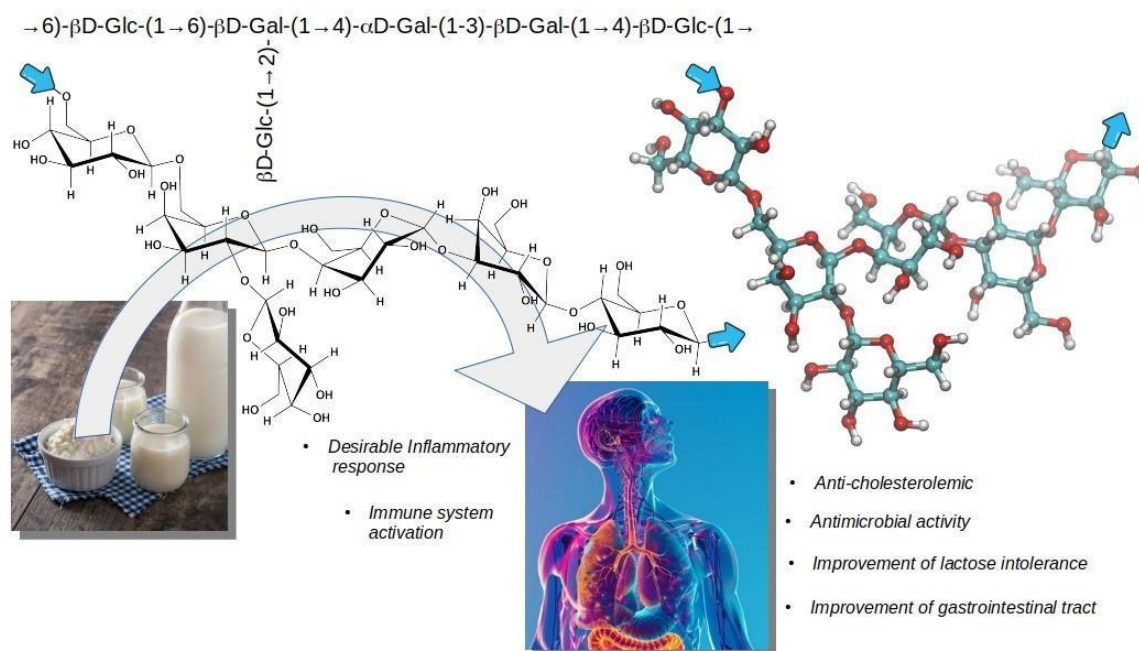


Figure 1. Monomeric structure of the kefir exopolysaccharide containing six monosaccharides and their alpha and beta-glycosidic linkages between D-glucose and D-galactose (Micheli et al., 1999).

the complex TLR-4-MD-2-Kefiran system from the molecular point of view, as shown in Figure 3.

The binding modes of kefiran with the TLR4-4-MD-2 complex were investigated using a molecular docking method. This compound was docked into the catalytic site of the receptor using the DockThor program (de Magalhães et al., 2014). The molecular docking was established in a cubic grid box (Δx , Δy , and Δz of 30, 30, and 30 Å), centered at coordinates x, y, z 26.0200, -10.3150, 13.5680 and discretization of the energy at 0.31 Å. The crystal structure of TLR4 complexed with MD-2 was obtained from the Protein Data Bank [PDB ID: 3FXI (Park et al., 2009b)]. We choose one of the subunits of the homodimer to investigate the ligand–receptor interactions at the binding site domain. The parameters are referred to as defaults in DockThor, and the structures with positional root mean square deviation (RMSD) of up to 2 Å were clustered together.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The biological behavior of the biopolymer kefiran has been explored from several approaches, including interactions with nutrients and protein receptors that justify its experimental and empiric health benefits. To understand these two possible molecular explanations, a time dependence of kefiran interactions

with vitamins, amino acids, saccharides, and lipids is discussed, followed by an exploration of its possible anchorage to the TLR4-MD-2 receptors.

3.1 The preferential kefiran–nutrient interactions

The kefiran mobility was analyzed by RMSD, as shown in Figure 4A. In an aqueous solution, kefiran was stabilized with the lowest RMSD values compared to an aqueous nutrient solution — a comparison between gray lines. The presence of nutrients promotes changes in the tetramer biopolymer reaching RMSD values higher than 10 Å at the end of 60 ns of simulation. It is explained by the short kefiran–nutrient interaction emerging and the possible loss of ownkefiran interactions. The nutrients presented different behaviors with high displacement for asparagine and medium displacement for histidine, aspartate, isoleucine, ascorbic acid, and glucose. In general, this find suggests a high translation of these nutrients around the kefiran tetramer without a specific place of anchoring. The most relevant vitamins seem to be more stabilized in a centered coordinate of atoms, showing less displacement in the simulation box. Similarly, the lipid model, trivalerate glycerol, was well stabilized, suggesting a possible anchoring on the biopolymer surface. In fact, Figure 4B shows the disposition of some molecules of lipids very close to kefiran, a phenomenon observed during all the simulation trajectories.

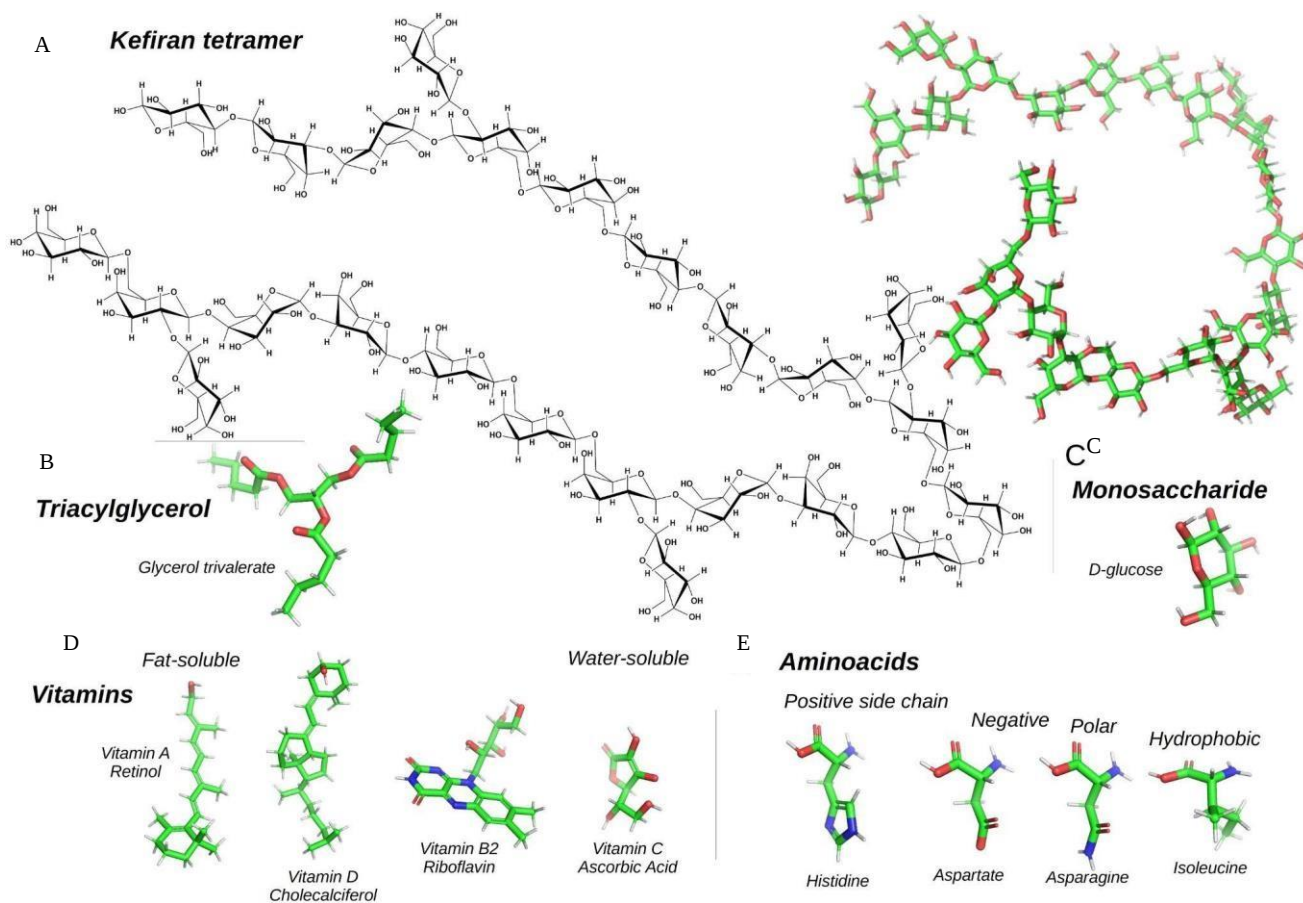


Figure 2. Structures modeled for simulations: (A) Kefiran tetramer; (B) triacylglycerol — glycerol trivalerate; (C) monosaccharide — D-glucose; (D) fat-soluble vitamins: vitamin A — retinol and vitamin D — cholecalciferol; water-soluble vitamins: vitamin B2 — riboflavin and vitamin C — ascorbic acid; and (E) amino acids: positive side chain histidine, negative aspartate, polar asparagine, and hydrophobic isoleucine.

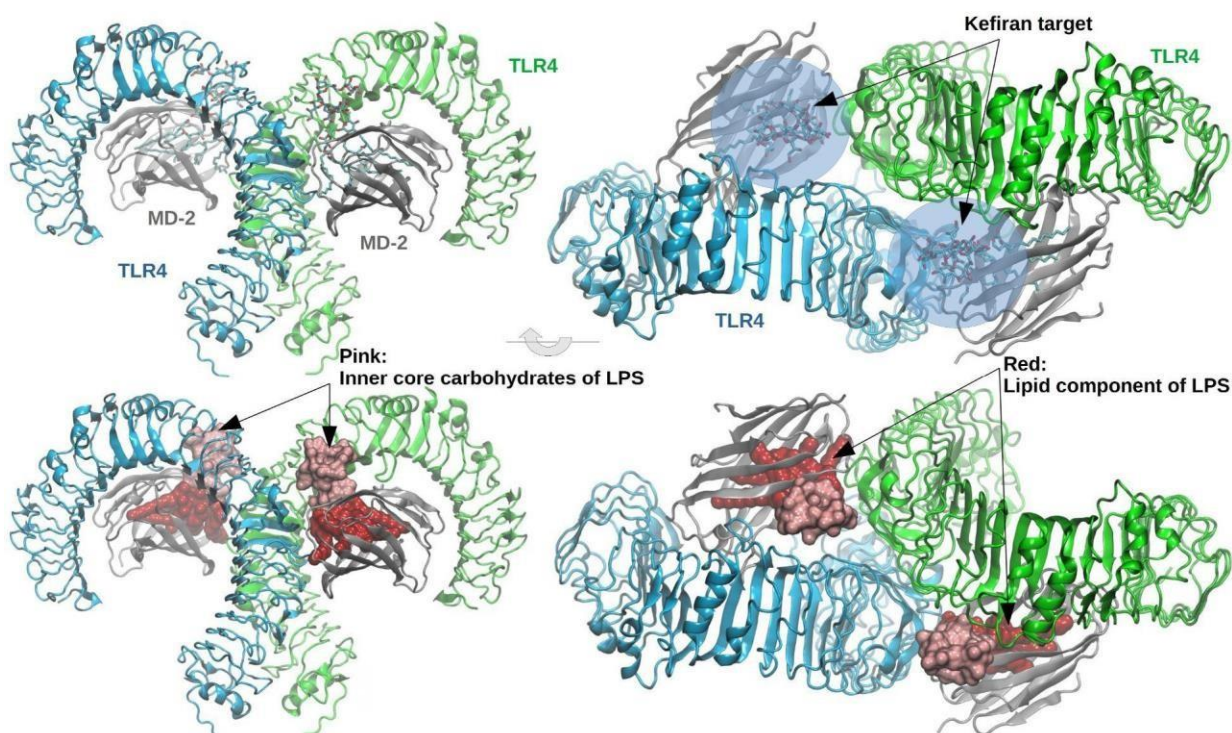


Figure 3. Overview of Toll-like receptor (TLR) 4 and myeloid differentiation factor 2 (MD-2), highlighting the lipopolysaccharide, LPS, binding site (Park et al., 2009a).

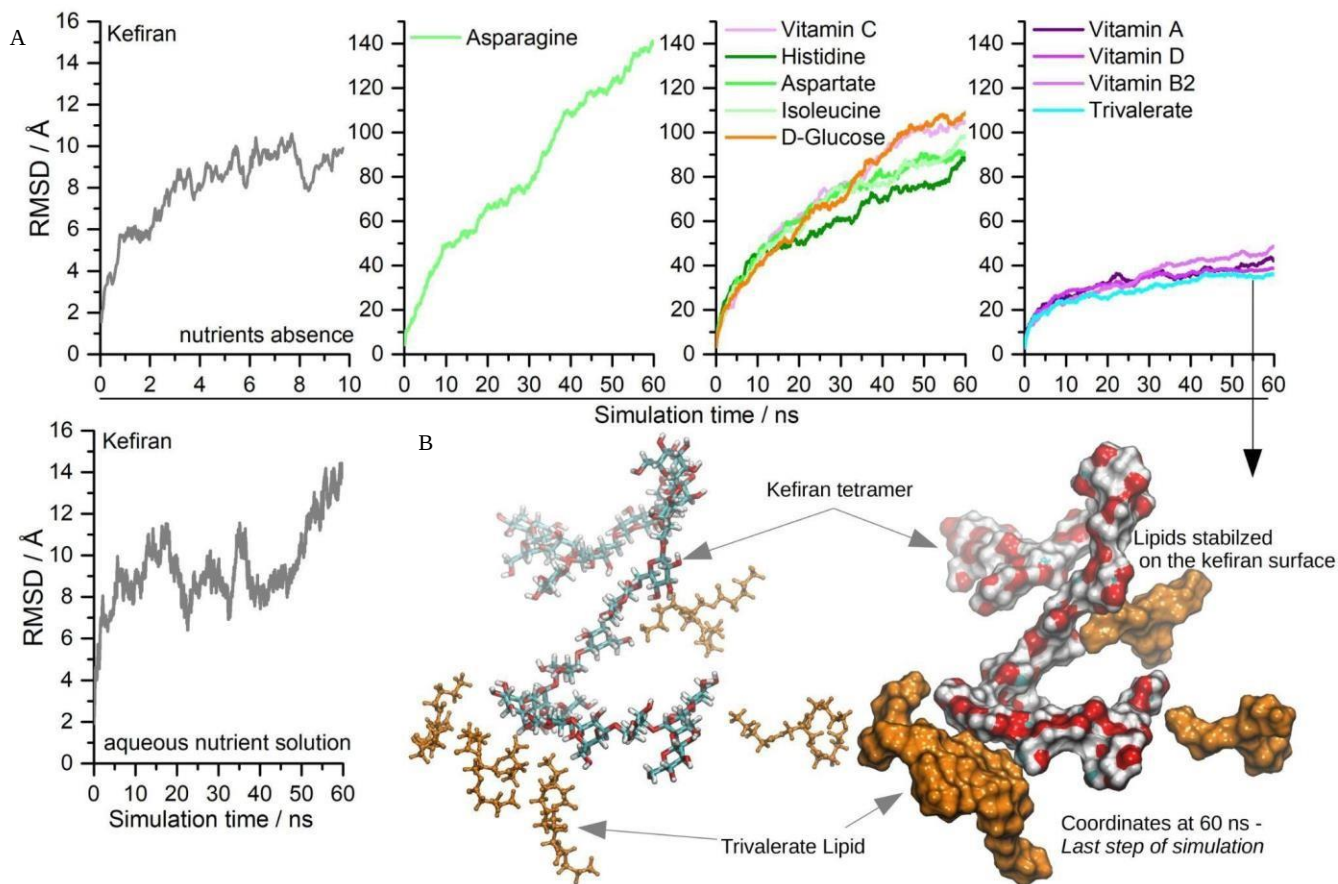


Figure 4. (A) RMSD of kefiran tetramer and nutrient components in the simulation trajectory. (B) Qualitative accumulation of the lipid glycerol trivalerate around the tetramer, the most stabilized nutrient in the simulation.

Distribution functions are adequate to understand the accumulation or repulsion of a solvent around a solute, especially minimum distance distribution functions (MDDFs), ideal for non-spheric solutes (de Oliveira & Martínez, 2019; Martínez & Shimizu, 2017). An overview of the preferential interactions between the kefir tetramer and nutrients shows a smooth displacement of water around the polysaccharide to accommodate especially hydrophobic compounds, as shown in Figure 5A. An exception of vitamin A, retinol, the other nonpolar nutrients are energetically allocated close to the polymer surface, as observed for vitamin D, cholecalciferol, and amino acid isoleucine. Surprisingly, the lipid model, glycerol trivalerate, is shown in Figure 5B with the highest accumulation around the kefir polymer. The kefir–lipid interaction is interesting; from this finding, it is possible to present the basis for understanding the related effect on immune activity response due to its similar LPS structure, with specific interaction in the TLR4-MD-2 receptors, for instance. In addition, solvation analyses of solvent–kefir accumulation at 3 Å from the polymer surface, Figure 5C, reinforce the MDDF findings, i.e., vitamins are frequently found close to the kefir tetramer, and the lipid trivalerate is frequently and quantitatively close to the kefir, as expected for a similar LPS structure.

3.2 Kefiran and TLR4-MD-2 interaction

Kefiran has been studied due to its functional properties, such as non-toxicity, antimicrobial activity, important nutritional value, and other promising characteristics (Tan et al., 2020). However, of the various biological effects of kefir and kefir highlighted in the literature, their role in modulating the immune system is the most studied and elucidated (Bahari et al., 2020; Gentry et al., 2023). Kefiran is known to modulate the cytokine profile (IL-4, IL-10, IL-6, IFN γ , and TNF α) and immunoglobulin IgA in BALB/c mice after 7 consecutive days of oral administration (Vinderola et al., 2006). *In vitro* assays show that kefir (50 μ g/mL) is capable of reducing responses mediated by Toll-like receptor 4 (TRL4) activation by the agonist LPS in monocytes derived from peripheral blood mononuclear cells. In this sense, kefir reduces the activity of LPS in inducing the production of cytokines IL-1 β and TNF- α in monocytes. On the other hand, it appears to induce the expression of IL-10, an inhibitory cytokine in inflammatory processes, in dendritic cells derived from monocytes. Such actions reflect the improvement of the innate immune function of these cells, with an increase in their phagocytosis capacity, a crucial aspect of

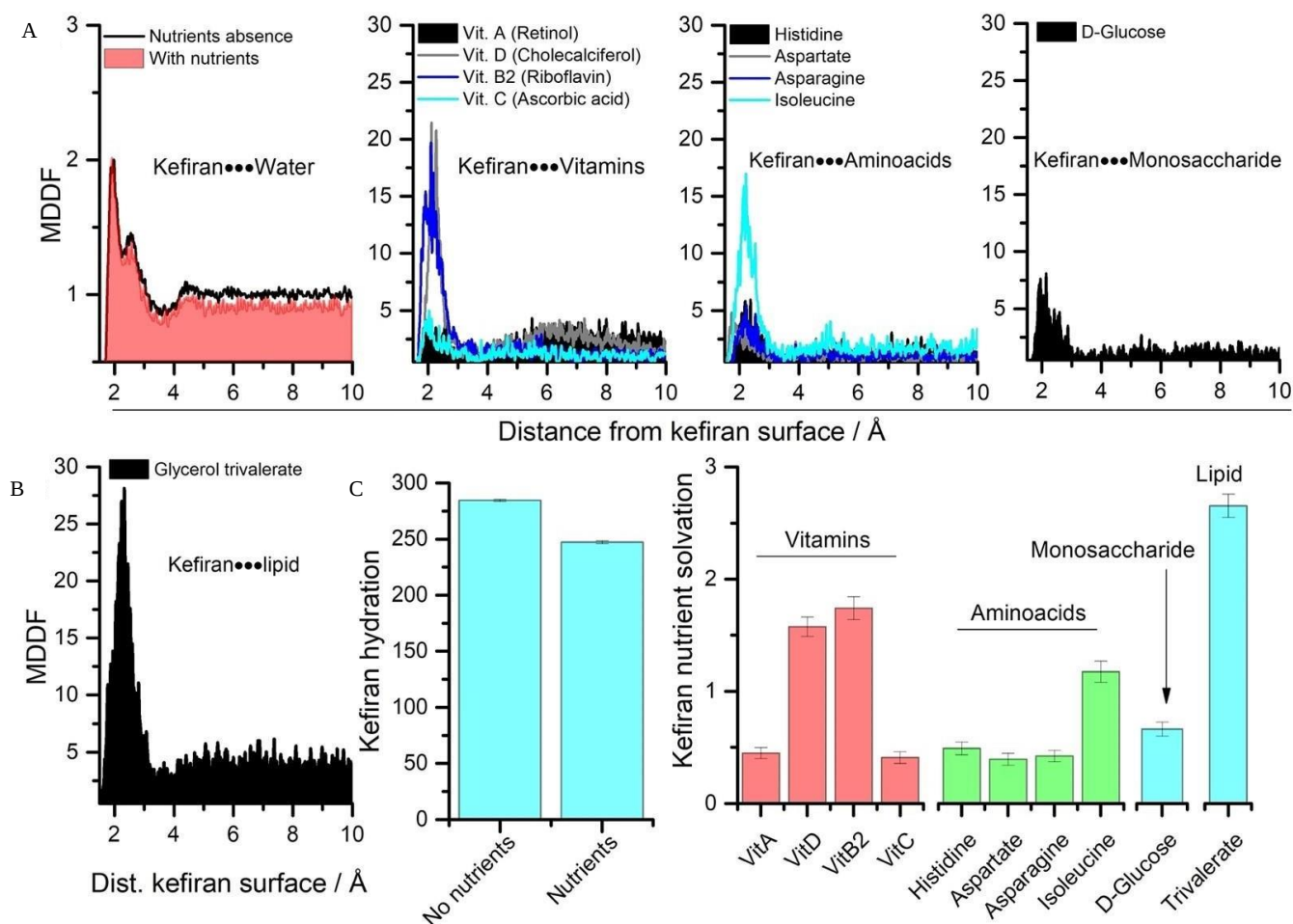


Figure 5. Preferential distribution of nutrients around the kefir tetramer surface according to the minimum distance distribution function (de Oliveira & Martínez, 2019; Martínez & Shimizu, 2017): (A) kefir and water, vitamins, amino acids, and monosaccharide; (B) MDDF kefir–lipid; and (C) kefir solvation at 3 Å from the polymer surface by water, and simulated nutrients.

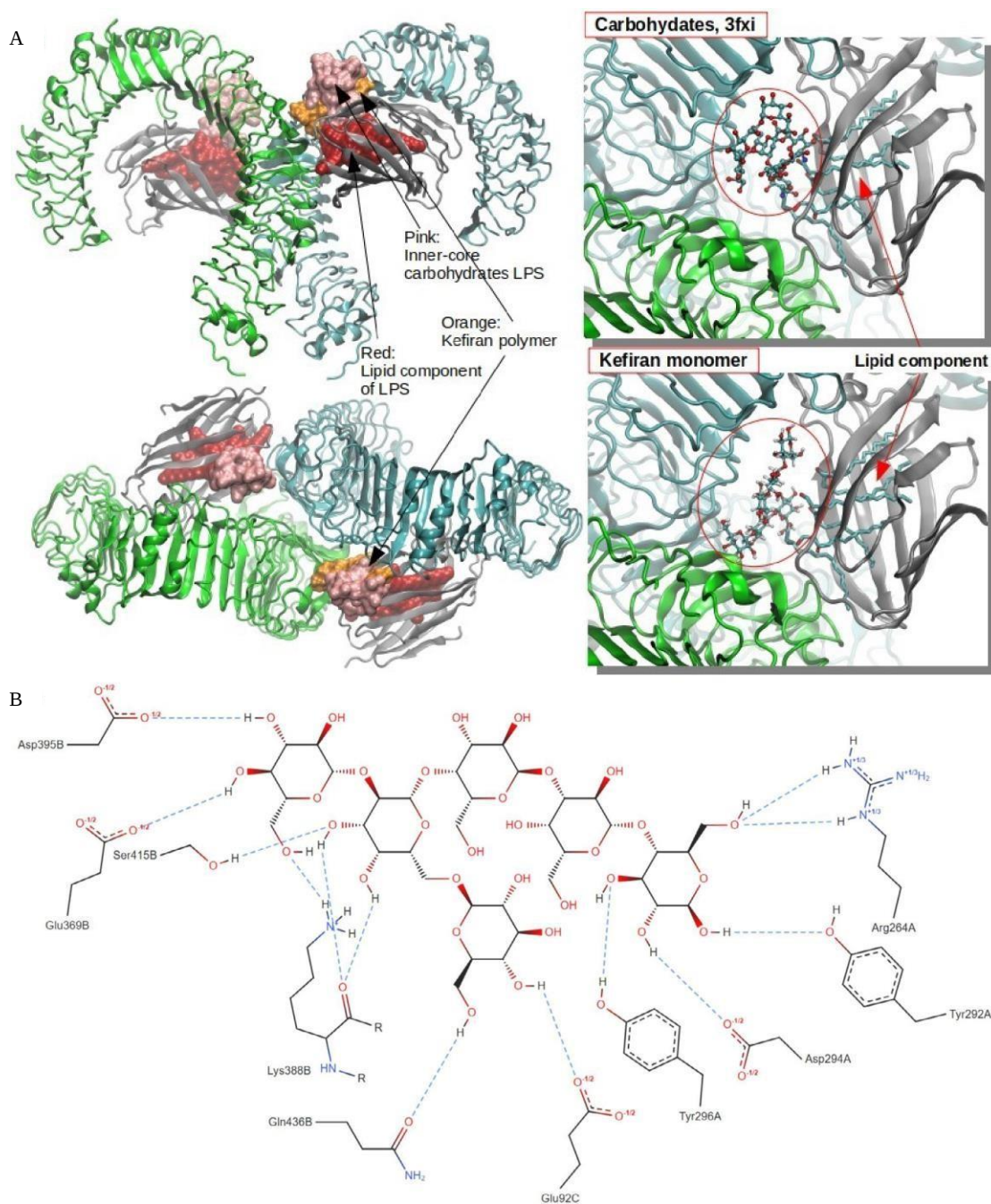


Figure 6. TLR-4-MD-2 complexed with kefir polysaccharides. (A) Similar position observed for both the carbohydrate component of LPS and kefir. (B) Sampled residues that stabilize kefir in the carbohydrate pocket such as Tyr296 and Asp294.

the defense against pathogens (Bahari et al., 2020; Park et al., 2009a). Figure 6 shows how kefir can interact with the TLR4-MD2 system, highlighting the residues that stabilize the ligand in the accommodation region of the carbohydrate part of LPS. The similarity between the binding modes allows us to infer its regulatory role similar to that expected for LPSs.

Kefiran appears to exert immunostimulatory effects both *in vitro* and *in vivo* because polysaccharides such as kefir can stimulate the production of specific antibodies without the recruitment of T cells or induction of immunological memory (Kalka-Moll et al.,

2002). In simple terms, kefir acts as a weak provocateur, but not to the point of inducing immunological memory and immunoglobulin class switching; it mildly stimulates the immune system. Some studies report that this ability may be associated with its binding to TLRs, especially TLR2 and TLR4 (Bahari et al., 2020).

4 CONCLUSIONS

From molecular modeling analysis, it was possible to establish an interaction profile of kefir with common nutrient

molecules such as vitamins, amino acids, monosaccharides, and lipids. The analyses allow us to infer a favorable interaction between kefir and the lipid-glycerol trivalerate, in addition to strong interactions with the fat-soluble vitamin cholecalciferol, in addition to the amino acid isoleucine. This property of interacting with nutrients with a hydrophobic profile makes it possible to interpret that kefir can bind to the interaction region of the carbohydrate portion of LPS in the TLR4-MD2 system, similarly to that expected for LPS, thus helping to explain its observed functional properties.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the financial support of FAPEMIG (grants 29628/APQ-01868-22, 31347/APQ-05670-23, and APQ-00727-23), FUNDEP/UFMG/PRPq (grants 30201 and 30563), CNPq, UFMA, and FAPEMA (grant BM-01649/23).

REFERENCES

- Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1999). Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research*, 66(2), 327-333. <https://doi.org/10.1017/s0022029999003490>
- Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., & Afreen, A. (2013). Kefir and health: a contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 422-434. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.540360>
- Bahari, A., Shahabi-Ghahfarokhi, I., & Koolivand, D. (2020). Kefiran ameliorates malfunctions in primary and functional immune cells caused by lipopolysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165(Part A), 619-624.
- Barcelos, M. C. S., Vespermann, K. A. C., Pelissari, F. M., & Molina, G. (2020). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), 1475-1495. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1575791>
- Borges, A., de Oliveira, I. P., Lescano, C. H., Parreira, R. L. T., Orenha, R. P., & da Silva de Laurentiz, R. (2023). Molecular interaction analysis of the lignans from Piper cubeba in complex with Haemonchus contortus phosphomethyltransferase. *Veterinary Parasitology*, 321, 110001. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.110001>
- da Silva, M. de S. B., & Okura, M. H. (2021). Kefir-based products developed and studied in Brazil. *Research, Society and Development*, 10(7), e19010716491. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16491>
- de Magalhães, C. S., Almeida, D. M., Barbosa, H. J. C., & Dardenne, L. E. (2014). A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. *Information Sciences*, 289, 206-224. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2014.08.002>
- de Oliveira, I. P., & Martínez, L. (2019). The shift in urea orientation at protein surfaces at low pH is compatible with a direct mechanism of protein denaturation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(1), 354-367. <https://doi.org/10.1039/c9cp05196a>
- Ganatsios, V., Nigam, P., Plessas, S., & Terpou, A. (2021). Kefir as a functional beverage gaining momentum towards its health promoting attributes. *Beverages*, 7(3), 48. <https://doi.org/10.3390/beverages7030048>
- Gentry, B., Cazón, P., & O'Brien, K. (2023). A comprehensive review of the production, beneficial properties, and applications of kefir, the kefir grain exopolysaccharide. *International Dairy Journal*, 144, 105691. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105691>
- Gomes, F. O., Silva, M. C. M., Sousa, P. B., Freitas, T. K. T., & Silva, D. J. S. (2020). Avaliação físico-química de uma bebida à base de kefir saborizada com pequi. *Brazilian Journal of Development*, 6(3), 10755-10762. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-084>
- González-Orozco, B. D., García-Cano, I., Jiménez-Flores, R., & Álvarez, V. B. (2022). Invited review: Milk kefir microbiota-Direct and indirect antimicrobial effects. *Journal of Dairy Science*, 105(5), 3703-3715. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21382>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Ibacache-Quiroga, C., González-Pizarro, K., Charifeh, M., Canales, C., Díaz-Viciedo, R., Schmachtenberg, O., & Dinamarca, M. A. (2022). Metagenomic and functional characterization of two Chilean kefir beverages reveals a dairy beverage containing active enzymes, short-chain fatty acids, microbial β -amyloids, and bio-film inhibitors. *Foods*, 11(7), 900. <https://doi.org/10.3390/foods11070900>
- Kalka-Moll, W. M., Tzianabos, A. O., Bryant, P. W., Niemeyer, M., Ploegh, H. L., & Kasper, D. L. (2002). Zwitterionic polysaccharides stimulate T cells by MHC class II-dependent interactions. *Journal of Immunology*, 169(11), 6149-6153. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6149>
- Kooiman, P. (1968). The chemical structure of kefir, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, 7(2), 200-211. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81138-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81138-6)
- Lescano, C. H., Freitas de Lima, F., Cardoso, C. A. L., Vieira, S. C. H., Mônica, F. Z., & Pires de Oliveira, I. (2021). Rutin present in Alibertia edulis extract acts on human platelet aggregation through inhibition of cyclooxygenase/thromboxane. *Food & Function*, 12(2), 802-814. <https://doi.org/10.1039/d0fo02276d>
- Martínez, L., Andrade, R., Birgin, E. G., & Martínez, J. M. (2009). PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 30(13), 2157-2164. <https://doi.org/10.1002/jcc.21224>
- Martínez, L., & Shimizu, S. (2017). Molecular interpretation of preferential interactions in protein solvation: a solvent-shell perspective by means of minimum-distance distribution functions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(12), 6358-6372. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00599>
- Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., & Crescenzi, V. (1999). Isolation and characterisation of a rosy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefir. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(1), 69-74. <https://doi.org/10.1007/s002530051616>
- Mukai, T., Toba, T., Itoh, T., & Adachi, S. (1990). Structural investigation of the capsular polysaccharide from Lactobacillus kefirifaciens K1. *Carbohydrate Research*, 204, 227-232. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)84039-w](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)84039-w)
- Nauss, J. L. (2000). CHARMm: Chemistry at Harvard Molecular Mechanics Workshop.
- Nelson, M. T. (1995). NAMD: A Parallel, Object-oriented Molecular Dynamics Program.
- Oliveira, I. P., & Caires, A. R. L. (2019). Molecular arrangement in diesel/bio-diesel blends: A Molecular Dynamics simulation analysis. *Renewable Energy*, 140, 203-211. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.061>
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B.-S., Lee, H., & Lee, J.-O. (2009a). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458(7242), 1191-1195. <https://doi.org/10.1038/nature07830>
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., & Lee, J.-O. (2009b). Crystal structure of the human TLR4-human MD-2-E.coli LPS Ra complex. <https://doi.org/10.2210/pdb3FXI/pdb>

- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. do C. G. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 82-96. <https://doi.org/10.1017/s0954422416000275>
- Shankar, T., Palpperumal, S., Kathiresan, D., Sankaralingam, S., Balachandran, C., Baskar, K., Hashem, A., Alqarawi, A. A., & Abd Allah, E. F. (2021). Biomedical and therapeutic potential of exopolysaccharides by isolated from sauerkraut: Screening and characterization. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(5), 2943-2950. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.030>
- Sperotto, L., Oliveira, E. V., Ferreira, F. A. T., Santos, F. B., Silva, H. X. B. N., Machado, K. R., P., L. H., Santos, R. C., Moreira, R. A., Azevedo, T. C. R., Camargo, W., & Matanna, P. (2017). Desenvolvimento de queijo cremoso com kefir: análises sensoriais e físico-químicas. *Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde*, (18), 60-68. Retrieved from <https://seer.utp.br/index.php/GR1/article/view/1494/1261>
- Tan, K.-X., Chamundeswari, V. N., & Loo, S. C. J. (2020). Prospects of kefir as a food-derived biopolymer for agri-food and biomedical applications. *RSC Advances*, 10(42), 25339-25351. <https://doi.org/10.1039/d0ra02810j>
- Vinderola, G., Perdígón, G., Duarte, J., Farnworth, E., & Matar, C. (2006). Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranoferiens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, 36(5-6), 254-260. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2007.01.003>
- Wang, B., Song, Q., Zhao, F., Han, Y., & Zhou, Z. (2019). Production optimization, partial characterization and properties of an exopolysaccharide from *Lactobacillus sakei* L3. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.241>
- Zottmann da Silva, I., & Weschenfelder, S. (2020). Caracterização físico-química e sensorial em queijo de kefir com e sem condimentos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 75(2), 83-93. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v75i2.795>
- 孝夫向井, 隆宏戸羽, 敏敏伊藤, & 達足立 (1988). ケフィール粒由来, ケフィランの構造における微視的不均一性. *日本畜産学会報*, 59(2), 167-176. <https://doi.org/10.2508/chikusan.59.167>

Produto 2: Manuscrito científico para submissão

Título

Kefiran: extração, purificação, caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana em isolados de *Candida albicans*

INTRODUÇÃO

Os biopolímeros têm atraído crescente interesse industrial devido à busca por materiais sustentáveis e biodegradáveis. Entre esses, os exopolissacarídeos (EPS) produzidos por microrganismos vêm se destacando por suas propriedades versáteis e aplicações em diversas áreas, como nas indústrias biomédica, farmacêutica, alimentícia e cosmética. Os EPS possuem funções estruturais e protetoras para os microrganismos que os sintetizam, além de apresentarem características físico-químicas que permitem seu uso como agentes gelificantes, emulsificantes, estabilizantes e bioativos, tornando-os valiosos para a indústria (MONTEIRO *et al.*, 2021; TAN *et al.*, 2020).

Dentre os EPS, o kefiran, produzido pelos microrganismos presentes nos grãos de kefir, tem se destacado pelo seu potencial funcional e bioativo. Esse biopolímero é composto predominantemente por D-glucose e D-galactose e forma a matriz polissacarídica que envolve os grãos de kefir, protegendo a microbiota e favorecendo a sobrevivência dos microrganismos em diferentes condições ambientais (DIAS *et al.*, 2018; LA RIVIÈRE; KOOIMAN, 1967). Além de sua função estrutural, o kefiran tem sido investigado devido às suas propriedades tecnológicas e biológicas, como efeito imunomodulador, propriedades antioxidantes e atividade antimicrobiana (WANG *et al.*, 2019; BARCELOS *et al.*, 2019).

A atividade antimicrobiana do kefiran é um dos aspectos mais promissores desse biopolímero, especialmente contra patógenos oportunistas, como as leveduras do gênero *Candida* (RODRIGUES *et al.*, 2005). *Candida albicans* é um dos principais agentes etiológicos de infecções fúngicas em humanos, incluindo a candidíase vulvovaginal, que representa um problema recorrente de saúde pública devido à alta taxa de reincidência e ao desenvolvimento de resistência aos antifúngicos convencionais (GIOLO *et al.*, 2010). Embora existam opções terapêuticas para o tratamento da candidíase, muitas delas estão associadas a efeitos adversos e à crescente resistência dos isolados clínicos (LIMA *et al.*, 2020).

Diante desse cenário, a busca por novas alternativas terapêuticas tem se intensificado, e compostos naturais com atividade antimicrobiana, como o kefiran, surgem como potenciais candidatos para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de infecções fúngicas.

Assim, este estudo teve como objetivo extrair, purificar e caracterizar o kefiran obtido a partir de grãos de kefir, além de avaliar sua atividade antimicrobiana frente a isolados de *Candida albicans*.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1- Materiais

Grãos de kefir foram doados pelo Laboratório de Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG. Leite UHT (3% de gordura), Porto Alegre S/A, Ponte Nova, MG, Brasil foi adquirido no comércio local da cidade de Montes Claros/MG, e utilizado para o cultivo de grãos de kefir.

Linhagens clínicas de *Candida albicans* provenientes da Coleção de Culturas da University Recife Mycologia- URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e uma cepa de referência da American Type Culture Collection- ATCC 60193, doada pelo Laboratório de Ecologia Microbiana da UFMG. As cepas foram mantidas em condições adequadas até o momento dos testes microbiológicos, armazenadas sob refrigeração até o momento dos testes microbiológicos.

Os meios de cultura Sabouraud Dextrose Agar e Mueller Hinton Agar, foram preparados de acordo com as instruções do fabricante KASVI e esterilizados a 121°C por 15 minutos. Os discos para antifungigrama utilizados (Cecon), contendo os seguintes antifúngicos de referência: fluconazol (25 mcg) e nistatina (100 U.I). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2- Cultivo de Grãos de Kefir

Os grãos de kefir utilizados neste estudo, inicialmente doados em estado congelado, foram ativados e cultivados diariamente por algumas semanas até atingir a quantidade necessária para os ensaios de fermentação. Durante esse período, os cultivos foram submetidos a controle de qualidade em laboratório, assegurando a segurança microbiológica da matéria-prima. A inoculação dos grãos de kefir foi realizada em triplicata.

2.3- Purificação e Extração de Kefiran

A extração do kefiran foi realizada conforme o protocolo adaptado de Martins *et al.* (2022). Para isso, 10 g de grãos de kefir foram adicionados a 100 mL de água destilada (proporção 1:10, m/v) e aquecidos a 90°C com agitação contínua a 250 RPM. Após o

aquecimento, o líquido resultante foi filtrado para remover os grãos de kefir e submetido a centrifugação a 4500 RPM, etapas de precipitação em etanol absoluto. A amostra foi armazenada a -20°C por 24 horas até as etapas subsequentes do protocolo.

2.4- Caracterização química do kefiran

Os testes de caracterização adotados para determinação da presença de carboidratos foram: Molisch (SANTOS *et al.*, 2005), Barfoed (adaptado de COELHO, 2024) e Fenol-sulfúrico (adaptado de DUBOIS *et al.*, 1956) e para determinar a presença de impurezas na amostra através da quantificação de proteínas foi realizado o teste de Bradford (adaptado de MARTINS, *et al.*, 2022).

2.5- Isolamento e pureza das cepas

As cepas de *Candida albicans* foram isoladas em meio Sabouraud Dextrose Agar e incubadas a 35°C por 24 horas. Após o crescimento, as colônias foram verificadas quanto à pureza por observação em microscopia, sendo realizadas subculturas em meio Sabouraud até se garantir a pureza do material microbiológico.

2.6- Antifungigrama pelo método de disco-difusão

O teste de disco-difusão foi realizado conforme as diretrizes da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). O inóculo foi preparado a partir de uma suspensão de *Candida albicans* ajustada para 0,5 na escala de McFarland, que foi espalhada uniformemente sobre as superfícies das placas de Petri contendo Mueller-Hinton Agar. Discos impregnados com fluconazol, nistatina e kefiran, foram posicionados sobre as placas, que foram incubadas a 35°C por 24 horas. A formação de halos de inibição foi medida após esse período.

2.7- Método de diluição em microplacas para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada utilizando o método de microdiluição em placas, conforme as orientações da Norma M27-A2 da CLSI, com modificações. A microplaca foi incubada a 35°C por 24 horas, e após esse período, a presença ou ausência de crescimento fúngico foi determinada pela adição de 20 µL de Trifenil Tetrazólio Cloreto (TTC), onde a coloração avermelhada indicou crescimento fúngico. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento visível do fungo.

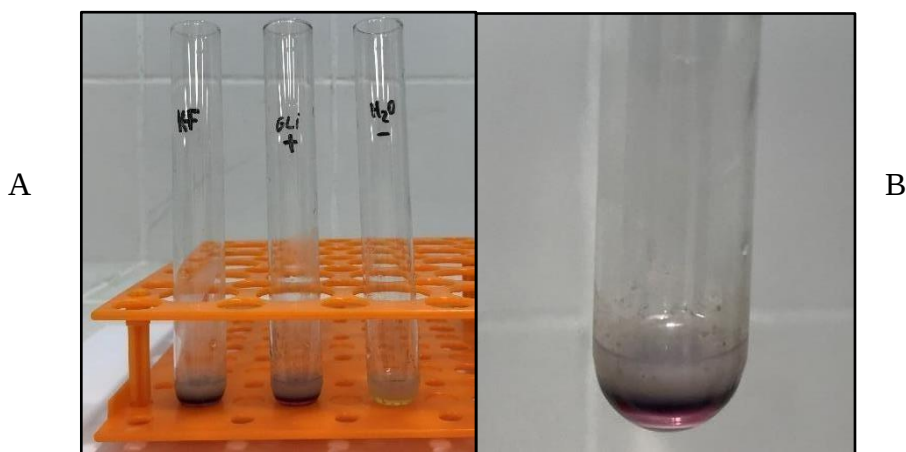
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a extração e purificação do kefiran, obteve-se um rendimento de 1,65%. No estudo de Silva *et al.* (2015), foram testados diferentes protocolos de extração, com diferentes métodos de solubilização. O protocolo que não utilizou solução alcalina de NaOH resultou em um rendimento de 1,58%. Moreira *et al.* (2008), ao utilizarem a extração com água quente, que é o mesmo tipo de extração empregado neste estudo, obtiveram um rendimento de 0,1% do fermentado na fase final. Neste sentido, apesar do baixo rendimento de extração, este resultado está de acordo com o encontrado por outros autores.

3.1- Testes de caracterização do composto kefiran

O teste de Molisch revelou a presença de açúcares na amostra analisada, evidenciada pela formação de um anel de coloração lilás (Figura 1). Os resultados obtidos estão em consonância com os achados de Picasso (2017), que destacou a utilidade do teste de Molisch como um indicativo qualitativo eficaz para a detecção de carboidratos em materiais extraídos. Corroborando achados semelhantes reportados por Cordeiro (2017), a autora também utilizou o ensaio de Molisch para detectar carboidratos em exopolissacarídeos, estes provenientes do kefir de água. Esses resultados reforçam a relevância do teste como uma etapa preliminar na caracterização qualitativa de carboidrato em amostras.

Figura 1. Teste de Molisch. (A) comparação do KF com a glicose e o controle negativo e (B) tubo contendo apenas a amostra de KF, com a formação de anel lilás.



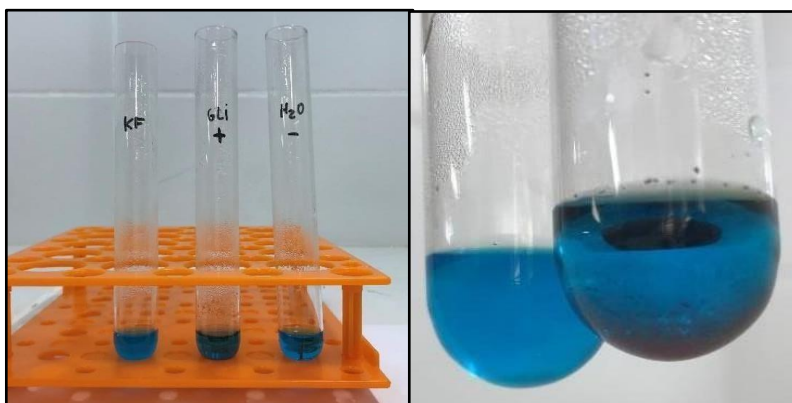
Fonte: Autor

Considerando que o kefiran é um polissacarídeo, o teste de Barfoed foi utilizado como contraprova para confirmar se a presença de açúcar, previamente identificada pelo teste de Molisch, referia-se ou não a um monossacarídeo. No entanto, ao adicionar o reagente de

Barfoed à amostra de kefir observou-se que a coloração permaneceu azulada, indicando a ausência de monossacarídeos. Confirmando que a amostra de kefir não contém monossacarídeos, mas sim um polissacarídeo, como esperado (Figura 2).

Figura 2. Teste de Barfoed. (A) comparação do KF, com a glicose e o controle negativo.

(B) um tubo contendo KF e outro contendo glicose com a formação de precipitado vermelho.



A

Fonte: Autor

B

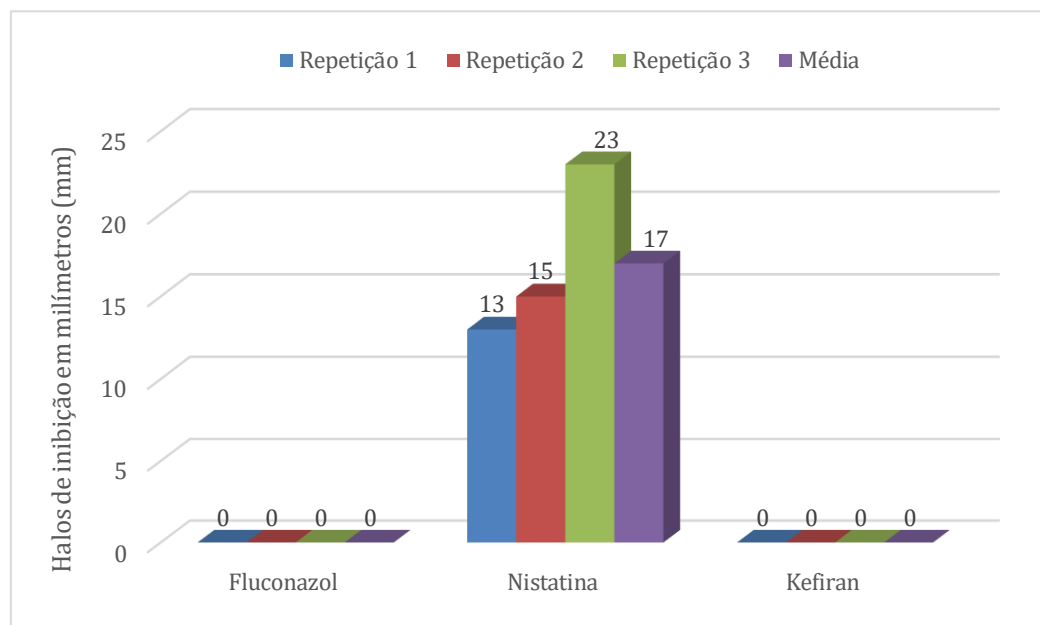
Após os cálculos realizados para a determinação de proteínas, foi obtido um valor de 0,053 mg/mg de proteínas por miligrama de kefir, valor que corrobora com os resultados apresentados por Martins *et al.* (2022). Esses autores relataram concentrações de proteínas variando entre $0,061 \pm 0,007$ mg/mg no Protocolo 1, $0,065 \pm 0,001$ mg/mg no Protocolo 2 e $0,410 \pm 0,014$ mg/mg no Protocolo 3. A proximidade do valor obtido com os resultados do Protocolo 1, de Martins *et al.* (2022) sugere que o método utilizado no presente estudo foi eficaz em isolar um kefir com baixo teor proteico. Essa baixa concentração proteica é esperada em kefir purificado, reforçando a eficiência do processo de extração e purificação empregado.

3.2- Determinação da atividade antifúngica

A Figura 3 apresenta os resultados do teste de disco-difusão para a cepa *Candida albicans* URM 4986, enquanto a Figura 5 exibe os resultados para a cepa ATCC 60193. A interpretação dos resultados foi realizada com base na tabela fornecida pelo fabricante. Para o antifúngico fluconazol, halos maiores que 19 mm são classificados como sensíveis (S), halos entre 14 e 19 mm como intermediários (I) e halos menores que 14 mm como resistentes (R). Já

para a nistatina, halos superiores a 10 mm são classificados como sensíveis (S) e inferiores a 10 mm como resistentes (R).

Figura 3. Gráfico do teste de disco-difusão para cepa URM 4986. Montes Claros 2024.



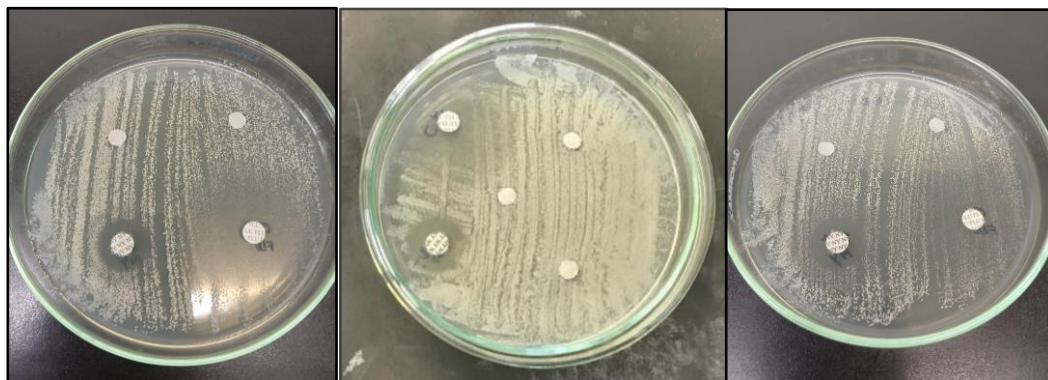
Fonte: Autor

Com base nos dados apresentados na Figura 3, observa-se que a cepa *Candida albicans* URM 4986 apresentou resistência tanto ao fluconazol quanto ao composto kefiran, uma vez que não houve formação de halos de inibição em nenhum dos dois casos. A resistência ao fluconazol pode ser explicada por vários mecanismos descritos na literatura.

Esse comportamento é consistente com outros estudos, como o de Silva et al. (2024), que também observou resistência ao fluconazol em uma espécie de *Candida albicans*, com ausência de halos de inibição. Da mesma forma, Quindós et al. (2007) analisaram aproximadamente 3.500 cepas de *C. albicans* e identificaram resistência ao fluconazol em uma parte delas.

Em relação à nistatina, os dados para a cepa *Candida albicans* URM 4986 indicaram sensibilidade ao antifúngico, com halos de inibição variando entre 13 mm (mínimo) e 23 mm (máximo), com uma média de 17 mm. Esse resultado é consistente com o relato de Silva et al. (2024), que observou um halo de 20 mm em *C. albicans*, indicando sensibilidade ao antifúngico. A nistatina se destaca na literatura por sua eficácia, associada a um perfil de segurança superior quando comparada a outros antifúngicos.

Figura 4. Placas do teste de disco-difusão para a cepa URM 4986

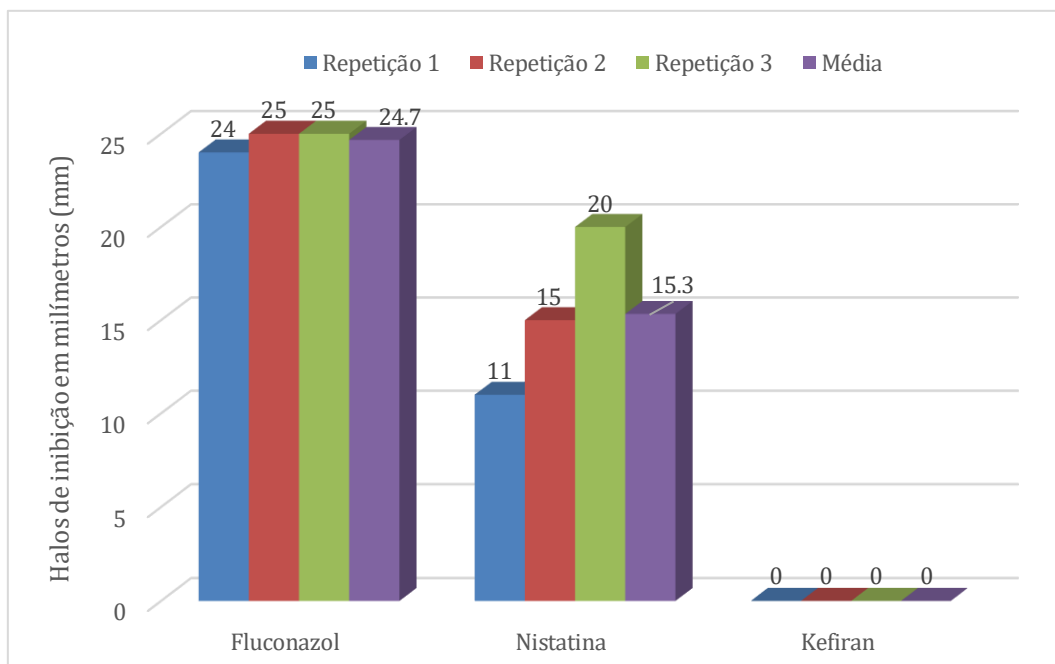


Fonte: Autor

A Figura 4 mostra uma placa referente ao teste de disco-difusão realizado com o isolado URM 4986. Nesse teste, observa-se a formação de halo de inibição no disco do antifúngico nistatina. No disco de fluconazol, embora haja um sombreado ao redor, o crescimento de colônias indica uma possível tentativa de inibição, mas sem a formação de um halo claro. Nos discos referentes ao composto kefiran e ao controle negativo, não foi observada formação de halos.

Os resultados apresentados na Figura 5 para a cepa *ATCC 60193* indicaram sensibilidade ao fluconazol, contrastando com a resistência observada na cepa *URM 4986*. Para a cepa *ATCC 60193*, os halos de inibição foram consistentes, variando entre 24 mm (mínimo) e 25 mm (máximo), com uma média de 24,7 mm. Estudos anteriores confirmam essa sensibilidade. Pfaller *et al.* (2007), ao avaliarem cepas de *Candida albicans* quanto à sensibilidade ao fluconazol por meio do teste de disco-difusão, observaram que aproximadamente 97,9% das cepas foram sensíveis ao antifúngico. De maneira similar, Porte *et al.* (2012) analisaram a sensibilidade de cepas de *C. albicans* a diversos antifúngicos, incluindo o fluconazol, e relataram que 91,8% das cepas testadas demonstraram sensibilidade ao medicamento.

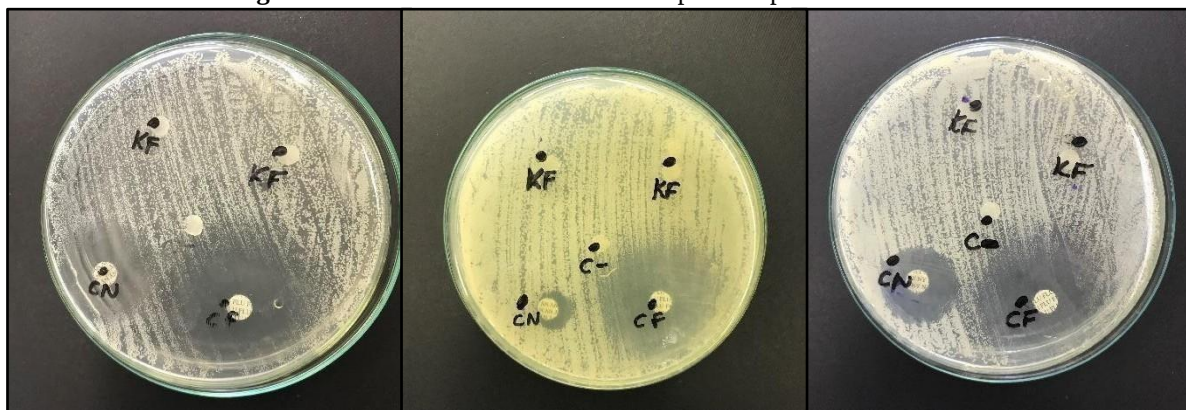
Figura 5. Gráfico do teste de disco-difusão para cepa ATCC 60193. Montes Claros 2024.



Fonte: Autor

No estudo de Silva *et al.* (2016), os resultados foram semelhantes, com sensibilidade ao fluconazol observada em 20 cepas da espécie *Candida albicans*. A mensuração dos halos foi realizada de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante (Cecon), corroborando os achados dos estudos anteriores. Quanto à nistatina, a cepa ATCC 60193 também demonstrou sensibilidade, com um halo de inibição médio de 15,3 mm, conforme mostrado na Figura 5. Silva *et al.* (2016) relataram valores próximos, com uma média de 15,96 mm, reforçando a eficácia da nistatina. Resultados semelhantes foram observados por Silva *et al.* (2024), que também encontraram sensibilidade à nistatina na cepa *C. albicans*, corroborando os estudos anteriores sobre a robustez da nistatina contra essa espécie.

A Figura 6 mostra placas do teste de disco-difusão realizado com o isolado ATCC 60193. Nessa análise, observa-se a formação de halos de inibição nos discos de fluconazol e nistatina. Nos discos referentes ao composto kefiran e ao controle negativo, não foi observada formação de halos.

Figura 6. Placas do teste de disco-difusão para a cepa ATCC 60193

Fonte: Autor

A Tabela 1 apresenta os resultados do teste de microdiluição em placas para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do composto kefiran frente aos isolados de *Candida albicans*. O teste é interpretado visualmente, com base na presença de coloração avermelhada nos poços da microplaca, indicando crescimento do microrganismo. Na ausência de coloração em algum dos poços, a concentração do composto utilizada nesse poço é considerada a CIM.

Tabela 1. CIM de Kefiran em cepas de *Candida albicans* - Resultados do teste 1

Cepa	Composto	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Resultado
ATCC 60193	Kefiran	150 mg/mL	150 mg/mL	150 mg/mL	CIM
		70 mg/mL	70 mg/mL	70 mg/mL	SA
		37 mg/mL	37 mg/mL	37 mg/mL	SA
URM 4986	Kefiran	150 mg/mL	150 mg/mL	150 mg/mL	SA
		70 mg/mL	70 mg/mL	70 mg/mL	SA
		37 mg/mL	37 mg/mL	37 mg/mL	SA

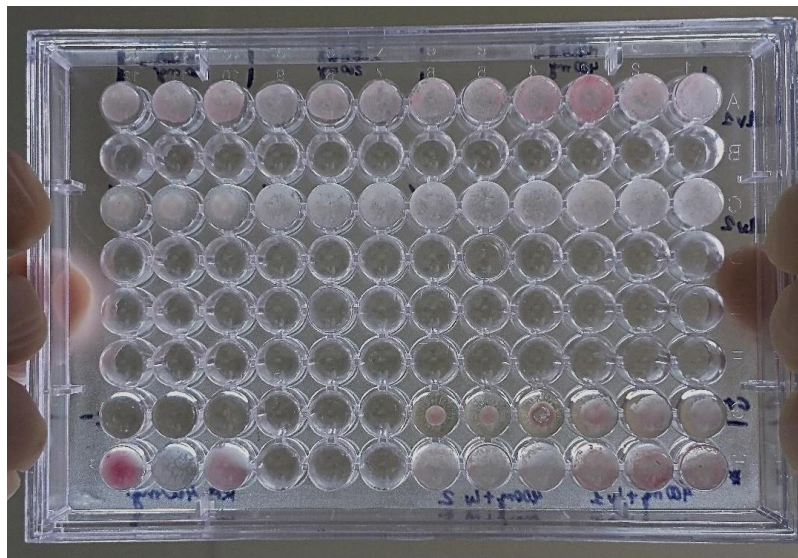
Fonte: Autor

CIM= Concentração inibitória mínima SA= Sem atividade antifúngica

Para o isolado ATCC 60193, observou-se que não houve crescimento fúngico visível na concentração de 150 mg/mL do composto. Contudo, em concentrações menores (70 e 37 mg/mL), foi possível observar o crescimento do fungo. No caso do isolado URM 4986, nenhuma concentração do composto apresentou atividade antifúngica. Em todas as concentrações testadas, houve crescimento visível nos poços da microplaca, conforme descrito na tabela 2.

A Tabela 2 apresenta os resultados de um segundo teste de microdiluição em placas, realizado com concentrações maiores do composto kefiran frente aos isolados de *Candida albicans* previamente estudados. O composto demonstrou resposta na cepa ATCC 60193 em duas concentrações (400 e 200 mg/mL). A concentração de 100 mg/mL não foi considerada, pois observou-se visualmente a formação de crescimento leve nos poços, conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7. Teste de diluição em microplaca para susceptibilidade antifúngica de Kefiran.



Fonte: Autor

Tabela 2. CIM de Kefiran em cepas de *Candida albicans* - Resultados do teste 2

Cepa	Composto	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Resultado
ATCC 60193	Kefiran	400 mg/mL	400 mg/mL	400 mg/mL	CIM
		200 mg/mL	200 mg/mL	200 mg/mL	CIM
		100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	-
URM 4986	Kefiran	400 mg/mL	400 mg/mL	400 mg/mL	SA
		200 mg/mL	200 mg/mL	200 mg/mL	SA
		100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	SA

Fonte: Autor

CIM= Concentração inibitória mínima SA= Sem atividade antifúngica

Para o isolado *URM 4986*, nenhuma concentração do composto apresentou atividade antifúngica, sendo possível observar crescimento visível em todos os poços da microplaca. A menor concentração (200 mg/mL) do composto que demonstrou sensibilidade foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud e incubada a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, com o objetivo de confirmar a atividade fungicida. Após o retrocultivo, observou-se que as concentrações de 400 e 200 mg/mL apresentaram ação fungistática contra o isolado *ATCC 60193*, inibindo o crescimento da cepa. No entanto, não foi detectada ação fungicida, pois houve crescimento de colônias na placa. Dessa forma, não foi possível determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) para este composto.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a extração e purificação do kefiran foram conduzidas de forma eficiente, garantindo a obtenção do polissacarídeo com qualidade. Essa eficiência foi confirmada pelos métodos de caracterização físico-química, que indicaram um baixo teor de proteínas residuais na amostra, evidenciando a eficácia do processo de purificação.

No ensaio de microdiluição em placas, o kefiran apresentou atividade fungistática contra a cepa *Candida albicans* ATCC 60193, inibindo seu crescimento, porém sem efeito fungicida, ou seja, sem capacidade de eliminar o fungo. Já os testes de difusão em disco não demonstraram ação inibitória do kefiran sobre o crescimento fúngico das cepas analisadas, tanto para *C. albicans* URM 4986 quanto para ATCC 60193.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste estudo mostraram que o kefiran apresentou atividade fungistática contra a cepa de *Candida albicans* ATCC 60193, inibindo seu crescimento, mas sem efeito fungicida. Essa ausência de ação letal pode ser atribuída à natureza prebiótica do kefiran, que provavelmente modula a microbiota e o sistema imunológico, em vez de atuar diretamente sobre o fungo. Esse efeito é reforçado pela simulação e modelagem molecular, que indicaram que o kefiran interagiu com nutrientes hidrofóbicos, como triacilglicerol (trivalerato), vitamina D (colecalciferol) e isoleucina, sugerindo sua capacidade de ligar-se ao lipopolissacarídeo (LPS) no sistema TLR4-MD2. Essa interação pode contribuir para a ativação do sistema imunológico e explicar suas propriedades funcionais.

Dessa forma, este estudo reforça o potencial do kefiran como um composto bioativo promissor, com possíveis aplicações terapêuticas e biotecnológicas. A integração entre ensaios microbiológicos e abordagens computacionais permitiu uma compreensão mais abrangente de suas propriedades, fornecendo bases para investigações futuras sobre suas aplicações em sistemas biológicos e na indústria farmacêutica.

7. PERSPECTIVAS

As perspectivas de pesquisa futura com base nos resultados deste estudo incluem:

- **Aprimorar os métodos de caracterização do kefiran**, utilizando técnicas avançadas como espectroscopia de absorção molecular, fluorescência, infravermelho, DLS (Dynamic Light Scattering), cromatografia, análises térmicas e microscopia eletrônica. Essas abordagens permitirão um perfil mais aprofundado das propriedades estruturais e funcionais do kefiran, fornecendo informações essenciais para a otimização de suas aplicações.
- **Desenvolver novos métodos de aplicação do kefiran**, como sistemas de liberação controlada e formulações combinadas, visando potencializar sua eficácia terapêutica. Esses avanços poderão facilitar o uso do kefiran em tratamentos específicos, tanto em produtos farmacêuticos quanto alimentícios.
- **Explorar o desenvolvimento de produtos alimentícios funcionais à base de kefiran**, com foco na criação de alimentos que promovam benefícios à saúde, como a modulação da microbiota intestinal e efeitos imunomoduladores. Esses produtos podem oferecer novas possibilidades para a indústria de alimentos funcionais.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. **Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design.** *Medicinal Research Reviews*, 2006.
- BAHARI, A.; SHAHABI-GHAHFARROKHI, I.; KOOLIVAND, D. **Kefiran ameliorates malfunctions in primary and functional immune cells caused by lipopolysaccharides.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 165, p. 619-624, 2020.
- BLANDÓN, L. M.; ISLAN, G. A.; CASTRO, G. R.; NOSEDA, M. D.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. **Microesferas de gel de Kefiran-alginato para entrega oral de ciprofloxacina.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 145, p. 706–715, 2016.
- BARCELOS, M. C. S.; VESPERMANN, K. A. C.; PELISSARI, F. M.; MOLINA, G. **Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 60, p. 1475–1495, 2020.
- BATISTA, V. S. *et al.* **Construção, otimização e ancoragem molecular de substâncias bioativas em biomacromoléculas: um tutorial prático.** *Química Nova*, v. 45, n. 2, p. 223–234, 2022.
- BORGES, A. *et al.* **Molecular interaction analysis of the lignans from *Piper cubeba* in complex with *Haemonchus contortus* phosphomethyltransferase.** *Veterinary Parasitology*, v. 321, p. 110001, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.110001>.
- BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. **Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes.** *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.
- CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards -6ª ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.
- CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, CLSI document M27-A2.** Wayne, PA., 2008.
- COELHO, Pedro. **Reagente de Barfoed: teste para monossacarídeos.** Disponível em: <https://www.engquimicasantosp.com.br/2020/10/reagente-barfoed-teste-monossacarideos.html>. Acesso em: 06 dez. 2024.
- CORDEIRO, Natália Almeida Onofre. **Kefir de água Bionat-I: análise metagenômica dos grãos, obtenção e caracterização estrutural do exopolissacarídeo Consoriana e seu potencial biotecnológico.** 2017. 160 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.
- CUNHA, P. L. R. da; PAULA, R. C. M. de; FEITOSA, J. P. A. **Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico.** *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DE MAGALHÃES, C. S.; ALMEIDA, D. M.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. **A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands.** *Information Sciences*, v. 289, p. 206-224, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ins.2014.08.002>.

DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TIMM, C. D. **Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de kefir.** *Ciência Animal Brasileira*, v. 19, p. e-40548, 2018.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. **Colorimetric Method for determination of sugars and related compounds.** *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350 - 356, 1956.

FERRAZ, Eduardo Gomes; SILVEIRA, Bruno Botto de Barros da; SARMENTO, Viviane Almeida; SANTOS, Jean Nunes dos. **Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses.** *RGO, Rev. gaúch. odontol. (Online)*, Porto Alegre, v. 59, n. 3, p. 123-130, jul./set. 2011.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.. **Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, n. 3, p. 225-234, jun. 2010.

GENTRY, Braley; CAZÓN, Patricia; O'BRIEN, Keely. **A comprehensive review of the production, beneficial properties, and applications of kefir, the kefir grain exopolysaccharide.** *International Dairy Journal*, v. 144, p. 105691, 2023.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS INC. **Bioplastics and Biopolymers – Market Research Report.** 2024. Disponível em: <https://www.strategyr.com/market-report-bioplastics-and-biopolymers-forecasts-global-industry-analysts-inc.asp>. Acesso em: 23 fev. 2025.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; KOK-TAS, T.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. **Review: Functional properties of kefir.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, n. 3, p. 261-268, 2011.

HUMPHREY, W.; DALE, A.; SCHULTEN, K. **VMD: visual molecular dynamics.** *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

KOOIMAN, A. **The chemical structure of kefir, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain.** *Carbohydrate Research*, v. 7, p. 200-211, 1968.

LA RIVIÈRE, J. W.; KOOIMAN, P. **Kefir, um novo polissacarídeo produzido no grão de kefir por *Lactobacillus brevis*.** *Archiv für Mikrobiologie*, v. 59, n. 1, p. 269-278, 1967.

LIMA, Josefa Aqueline Cunha; SILVA, Jadson Farias; CAIANA, Rodrigo Ribeiro Alves; SILVA JÚNIOR, Josivan Pereira; OLIVEIRA, Wylly Araujo; FREITAS, Juliano Carlo Rufino. **Síntese, atividade antifúngica e docking molecular de derivados do eugenol.** *Scientia Plena, [S. l.]*, v. 16, n. 5, 2020.

LESCANO, C. H.; FREITAS DE LIMA, F.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, S. C. H.; MÓNICA, F. Z.; PIRES DE OLIVEIRA, I. **Rutin present in *Alibertia edulis* extract acts on human platelet aggregation through inhibition of cyclooxygenase/thromboxane.** *Food & Function*, v. 12, n. 2, p. 802-814, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d0fo02276d>.

MAEDA, H. *et al.* **Effects of an exopolysaccharide (kefir) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation.** *Biofactors*, v. 22, p. 197–200, 2004.

MARTÍNEZ, L.; ANDRADE, R.; BIRGIN, E. G.; MARTÍNEZ, J. M. **PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations.** *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 13, p. 2157-2164, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21224>.

MARTINS, E. F. *et al.* **Determination and standardization of the kefir extraction protocol for possible pharmacological applications.** *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, v. 3, n. 6, 2022.

MICHELI, M. R. *et al.* **Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* WT-2B(T).** *Carbohydrate Research*, v. 320, p. 108–116, 1999.

MONTEIRO, Rejane Gonçalves; SILVA, Elaine Cristina da; MARTINS, Anna Larissa Cerqueira; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo; SOARES, Maria Taciana Cavalcanti Vieira. **O efeito dos exopolissacarídeos obtidos a partir de bactérias ácido lácticas como prebiótico: uma revisão sistemática.** Research, Society and Development. 2021.

MORADI, Z.; KALANPOUR, N. **Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications.** *Carbohydrate Polymers*, v. 223, p. 115100, 2019.

MOREIRA, M. E. C.; SANTOS, M. H.; PEREIRA, I. O.; FERRAZ, V.; BARBOSA, L. C. A.; SCHNEEDORF, J. M. **Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir.** *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1723-1728, 2008.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. H. T. P. da. **Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos.** *Eclética Química*, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NAUSS, J. L. **CHARMm: Chemistry at Harvard Molecular Mechanics Workshop.** 2000.

NELSON, M. T. **NAMD: A Parallel, Object-oriented Molecular Dynamics Program.** 1995.

NELSON, David. L.; COX, Michael. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 5. ed.

Norma ABNT NBR 15448-1. **Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis Parte 1: Terminologia.** 2008.

OLIVEIRA, I. P.; CAIRES, A. R. L. **Molecular arrangement in diesel/biodiesel blends: A Molecular Dynamics simulation analysis.** *Renewable Energy*, v. 140, p. 203-211, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.061>.

OROZCO, B. D. G. *et al.* **Invited review: Milk kefir microbiota—Direct and indirect antimicrobial effects.** *Journal of Dairy Science*, v. 105, n. 5, 2022.

PARK, B. S.; SONG, D. H.; KIM, H. M.; CHOI, B.-S.; LEE, H.; LEE, J.-O. **The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex.** *Nature*, v. 458, n. 7242, p. 1191-1195, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07830>.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; MEIS, J. F.; GOULD, I. M.; FU, W.; COLOMBO, A. L.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E. **Resultados do estudo ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance, 1997 a 2005: uma análise de 8,5 anos de suscetibilidades de espécies de *Candida* e outras espécies de leveduras a fluconazol e voriconazol determinado por testes de difusão em disco padronizados do CLSI.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 1735-1745, jun. 2007.

PICASSO, Regina Silva. **Caracterização estrutural e atividade citotóxica e imunomodulatória de um novo exopolissacarídeo extraído dos grãos de Kefir.** 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em Morfotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

PIERMARIA, J. *et al.* **Kefiran films plasticized with sugars and polyols: Water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy.** *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 1261–1269, 2011.

PORTE, L.; LEÓN, P.; GÁRATE, C.; GUZMÁN, A. M.; LABARCA, J.; GARCÍA, P. **Susceptibilidad a azoles y anfotericina B de aislados de *Candida spp.* Experiencia de una red de salud universitaria, entre 2004 e 2010 [Susceptibilidade aos azóis e à anfotericina B dos isolados de *Candida spp.* Experiência de uma rede universitária de saúde, entre 2004 e 2010].** *Revista Chilena de Infectología*, 2012.

QUEIROZ, J.H. **Práticas de Bioquímica.** Viçosa, MG; Ed. UFV, 2007. (Cadernos didáticos;119).

QUINDÓS, G.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ERASO, E.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J. **Actividad antifúngica *in vitro* de voriconazol: nuevos datos después de los primeros años de experiencia clínica [Atividade antifúngica *in vitro* do voriconazol: novos dados após os primeiros anos de experiência clínica].** *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, n. 3, p. 198-208, 30 set. 2007.

RADHOUANI, H.; GONÇALVES, C.; MAIA, F. R.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. **Biopolímero de Kefiran: Avaliação de suas propriedades físico-químicas e biológicas.** *Jornal de Polímeros Bioativos e Compatíveis*, v. 33, n. 5, p. 461-478, 2018. DOI: 10.1177/0883911518793914.

ROCHA, W. R. V. da; NUNES, L. E. .; NEVES, M. L. R. .; XIMENES, E. C. P. de A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. de A. ***Candida* genus - Virulence factores, Epidemiology, Candidiasis and Resistance mechanisms. Research, Society and Development, [S. l.], v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021.**

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, n. 5, p. 383-386, maio 2005.

SANTANA, Diorgenes Pinto; RIBEIRO, Evandro Leão; MENEZES, Antônio Carlos Severo; NAVES, Plínio Lázaro Faleiro. **Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*.** *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2013.

SANTOS, Custódio Donizete dos; ABREU, Celeste Maria Patto de; CORRÊA, Angelita Duarte; PAIVA, Luciano Vilela. **Bioquímica experimental.** Lavras: Editora UFLA, 2005.

SHANKAR, T.; PALPPERUMAL, S.; KATHIRESAN, D.; SANKARALINGAM, S.; BALACHANDRAN, C.; BASKAR, K.; HASHEM, A.; ALQARAWI, A. A.; ABD ALLAH, E. F. **Biomedical and therapeutic potential of exopolysaccharides isolated from sauerkraut: Screening and characterization.** *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 28, p. 2943–2950, 2021.

SILVA, A. P. da; RODRIGUES, T. P.; KLAUCK, J. A. P.; RICARDO, L. L. **Associação de antifúngicos comerciais com óleo essencial de *Lavandula dentata* L. frente à *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.** *Revista JRG de Estudos Acadêmicos*, Brasil, São Paulo, v. 7, n. 14, p. e141251, 2024.

SILVA, A. C. N.; VASCONCELOS JÚNIOR, A. A.; CUNHA, F. A.; CUNHA, M. C. S. O.; MENEZES, E. A. **Teste de sensibilidade de *Candida albicans* pelo método de disco-difusão: uma comparação de meios de cultura.** *RBAC*, v. 48, n. 4, p. 363-369, 2016.

SIQUEIRA, T. H.; MARTÍNEZ, L. **Simulações moleculares da inibição da biossíntese de esterol mediada pelo fluconazol.** *Jornal de Estrutura e Dinâmica Biomolecular*, v. 38, n. 6, p. 1659–1669, 4 jul. 2019.

SOUSA, J. N. *et al.* **Oral gallic acid improve liver steatosis and metabolism modulating hepatic lipogenic markers in obese mice.** *Experimental Gerontology*, 134, 2020.

TAN, K.-X.; CHAMUNDESWARI, V. N.; LOO, S. C. J. **Prospects of kefir as a food-derived biopolymer for agri-food and biomedical applications.** *RSC Advances*, v. 10, p. 25339–25351, 2020.

UCHIDA, M. *et al.* **Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet.** *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, v. 17, n. 9, p. 980–988, 2010.

VIEIRA, Darlene Ana de Paula; QUEIROZ, Nayara Cláudia de Assunção. **Microbiologia Geral.** Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

VIEIRA, Ana Júlia Hoffmann; SANTOS, Jairo Ivo dos. **Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina.** *Revista Brasileira de Análises clínicas*, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201600407>.

WANG, B.; SONG, Q.; ZHAO, F.; HAN, Y.; ZHOU, Z. **Production optimization, partial characterization and properties of an exopolysaccharide from *Lactobacillus sakei* L3.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 141, p. 21–28, 2019.

ANEXOS

ANEXO A –Registro de publicação do Produto 1



Atual Arquivos Sobre ▾

Q Buscar

Início / Arquivos / v. 44 (2024) / Artigos Originais

Molecular analysis of Kefiran exopolysaccharide: Interactions with vitamins, amino acids, monosaccharides, lipids, and Toll-like receptor 4

Laudelina Ferreira de ANDRADE

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Sistemas Moleculares Aplicados, Montes Claros, MG, Brazil.

<https://orcid.org/0009-0000-7160-9989>

Rebeca Santana da COSTA

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Sistemas Moleculares Aplicados, Montes Claros, MG, Brazil.

<https://orcid.org/0009-0006-8547-5778>

Melissa Biazzi FILA

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Sistemas Moleculares Aplicados, Montes Claros, MG, Brazil.

<https://orcid.org/0009-0004-9767-8762>

Daniela Cácia dos SANTOS

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Sistemas Moleculares Aplicados, Montes Claros, MG, Brazil.

<https://orcid.org/0009-0003-7651-0103>

Tamirys Caroline Silva SOUZA

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Sistemas Moleculares Aplicados, Montes Claros, MG, Brazil.



PDF (English)

Enviar Submissão

Idioma

Português (Brasil)

English

Informações

Para Leitores

Para Autores

Para Bibliotecários