



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ROBERT SARAIVA MATOS

**CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DE BIOFILMES DE KEFIR ASSOCIADO AO
EXTRATO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E DE CUPUAÇU (*Theobroma
grandiflorum* Shum)**

MACAPÁ
2015

ROBERT SARAIVA MATOS

**CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DE BIOFILMES DE KEFIR ASSOCIADO AO
EXTRATO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E DE CUPUAÇU (*Theobroma
grandiflorum* Shum)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Amapá, na área de concentração de Nanotecnologia aplicada a fármacos.

Orientador: Prof. Dr. Robert Ronald Maguiña Zamora

MACAPÁ
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.1

M433c Matos, Robert Saraiva.

Caracterização superficial de biofilmes de Kefir associado ao extrato de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Shum) / Robert Saraiva Matos; orientador, Robert Ronald Maguiña Zamora. – Macapá, 2015.

58 p.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Atividades farmacológicas - Kefir. 2. Biofilme. 3. Atividades terapêuticas – Cupuaçu. 4. Atividades terapêuticas – Açaí. I. Maguiña Zamora, Robert Saraiva, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

ROBERT SARAIVA MATOS

**CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DE BIOFILMES DE KEFIR ASSOCIADO AO
EXTRATO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E DE CUPUAÇU (*Theobroma
grandiflorum* Shum)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Amapá, na área de concentração de Nanotecnologia aplicada a fármacos.

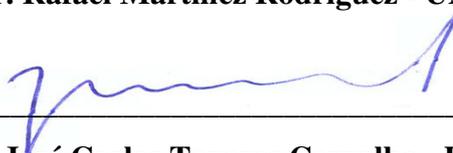
Data de Aprovação: **21/12/2015**



Prof. Dr. Robert Ronald Maguiña Zamora - UNIFAP



Prof. Dr. Rafael Martinez Rodriguez - UNIFAP



Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho - UNIFAP

MACAPÁ
2015

A Deus, esposa, filhas e amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Robert Ronald Maguiña Zamora por suas orientações e discussões neste trabalho.

Ao aluno de doutorado Antonio Ferreira de Oliveira do Laboratório de Pesquisa em Fármacos pelas dicas e ajuda na obtenção de Biofilmes.

Ao Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho, pela disponibilização de equipamentos no Laboratório de Pesquisa em Fármacos, UNIFAP.

Ao colega Sandro de Souza Figueiredo pela instrução inicial sobre a parte técnica do AFM e DRX.

Ao amigo Erveton Pinheiro Pinto, pela ajuda na análise dos difratogramas desta pesquisa.

A minha esposa Tiffany Jaira Raiol Matos que sempre me deu força quando mais precisei nas indecisões e nos estresses relacionados ao trabalho.

A minha mãe (*in memoriam*) mulher guerreira que sonhava um futuro melhor para mim e meus irmãos.

*Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá.
A única segurança verdadeira consiste numa reserva de
sabedoria, de experiência e de competência.”
(Henry Ford).*

RESUMO

Neste estudo foi realizada a caracterização superficial de biofilmes de kefir, kefir com extrato de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Shum) e kefir com extrato de Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) obtidos a partir da inoculação de grãos de kefir em solução de açúcar mascavo. Foram realizados quatro ensaios para obtenção dos biofilmes; nestes obtiveram-se biofilmes sem Kefir, biofilmes de Kefir, biofilmes de Kefir com extrato de Cupuaçu e biofilmes de kefir com extrato de Açaí. A cristalinidade dos biofilmes foi analisada utilizando difração de raios-X (DRX); Esta revelou uma estrutura amorfa-cristalina. Estes resultados foram explicados pela microestrutura do biofilme, que foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM), demonstrando uma dependência crescente da rugosidade com a concentração de substrato, principalmente, para os biofilmes de Cupuaçu e Açaí. A homogeneidade da superfície dos biofilmes foi determinada; Esta revelou que todos os biofilmes têm distribuição uniforme de alturas na superfície. A pesquisa mostrou que as superfícies dos biofilmes de kefir, kefir com extrato de Cupuaçu e kefir com extrato de Açaí caracterizam-se por amorficidade, não existindo grandes picos associados a estruturas cristalinas; alta rugosidade indicando que os biofilmes possuem boa adesividade e uniformidade na distribuição dos picos superficiais, apontando que uma vez aderidos a uma superfície não haverá formação de bolhas em sua superfície. Assim, em uma perspectiva de aplicação na indústria farmacêutica os biofilmes podem ser usados como curativos naturais.

Palavras chave: Biofilmes, Kefir, Açaí, Cupuaçu, Adesividade.

ABSTRACT

This study was carried a superficial characterization of kefir biofilms, kefir with Cupuassu berry Extract (*Theobroma grandiflorum* Shum) and kefir with Açai extract (*Euterpe oleracea* Mart.) obtained from the inoculation of kefir grains in brown sugar solution. Four trials to obtain the biofilms were performed; these biofilms were obtained without Kefir, Kefir biofilms, Kefir biofilms with Cupuassu extract and biofilms of kefir with Açai berry extract. The crystallinity of the biofilms was analyzed using X-ray diffraction (XRD); this revealed an amorphous-crystalline structure. These results were explained by the biofilm microstructure, which were analyzed by atomic force microscopy (AFM), demonstrating a growing dependence of roughness on the substrate concentration, particularly for Cupuassu biofilms and Açai. The homogeneity of the surface of the biofilms was determined; this revealed that all biofilms have a uniform distribution of the surface heights. The research has shown that the surfaces of kefir biofilms, kefir with Cupuassu extract and kefir with Açai extract are characterized by amorphicity, not have high peaks associated with crystalline structures; High roughness indicating that biofilms have good adhesion and uniform distribution of surface peaks, indicating that once adhered to a surface there no formation of bubbles on its surface. Thus, in an application perspective biofilms in the pharmaceutical industry can be used as a natural bad aid.

Keywords: Biofilms, Kefir, Açai, Cupuassu, Adhesiveness.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	(<i>Atomic Force Microscopy</i>) Microscopia e Força Atômica
ANOVA	(<i>Analysis of Variance</i>) Análise de Variância
DRX	(<i>Diffraction X-Ray</i>) Difração de Raios-X
LDL	(<i>Low Density Lipoprotein</i>) Lipoproteína de Baixa Densidade
R_M	Rugosidade Média
R_{RMS}	(<i>Root Mean Square</i>) Raíz Quadrada da Média da rugosidade
RRS	(<i>Random Rough Surface</i>) Superfície Aleatoriamente Rugosa
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequena Empresa
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
VEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente a Vitamina C

LISTA DE SÍMBOLOS

S_a	Rugosidade média RMS
S_q	Raiz quadrática média da Rugosidade RMS
$Z_{(x,y)}$	Função altura da área sobre a curva
S	Entropia
S_{dq}	Gradiente da Raiz Quadrática Média
k	Constante de Boltzmann
w	Número de Microestados
k	Número quântico principal
α	Radiação Alpha
λ	Comprimento de onda
$H_{hei.matr}$	Entropia de Shannon obtida de uma matriz de alturas topográficas
$H_{hei.dist}$	Entropia de Shannon obtida de uma distribuição de alturas topográficas
δ	Tamanho dos bins
h_{ij}	Altura correspondente do ponto (i, j)
p_k	Probabilidade de aparecer uma altura em um bin
n_k	Número de alturas em um bin
N	Número de pixels
η	Número de pixels que não contribuem para a uniformidade
θ	Ângulo de Bragg
Cu	Elemento cobre
g	Gramas
nm	Nanômetro
L	Litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1.O KEFIR.....	13
1.1.1. Identificação e Obtenção do Kefir.....	13
1.1.2. Atividades Terapêuticas e Farmacológicas do Kefir.....	13
1.1.3. Microorganismos presentes no Kefir.....	15
1.2.O BIOFILME.....	16
1.2.1. Definição e Formação de Biofilmes.....	16
1.2.2. Biofilmes de Kefir.....	18
1.3.O CUPUAÇU.....	19
1.3.1. Identificação e Uso do Cupuaçu.....	20
1.3.2. Atividades Terapêuticas do Cupuaçu.....	20
1.3.3. Atividade Antioxidante do Cupuaçu.....	20
1.4.O AÇAÍ.....	22
1.4.1. Identificação e Uso do Açaí.....	22
1.4.2. Atividades Terapêuticas e Farmacológicas do Açaí.....	22
1.5. PARÂMETROS DE ANÁLISE SUPERFICIAL DE BIOFILMES.....	24
1.5.1. Rugosidade Superficial.....	24
1.5.2. Microscopia de Força Atômica.....	25
1.5.3. Difractometria de Raios-X (XRD).....	26
1.5.4. Homogeneidade Superficial.....	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DE BIOFILMES DE KEFIR ASSOCIADO AO EXTRATO DE AÇAÍ (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) E EXTRATO DE CUPUAÇU (<i>Theobroma grandiflorum</i> Shum) (SUPERFICIAL CHARACTERISATION OF KEFIR BIOFILMS ASSOCIATE TO AÇAÍ EXTRACT (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) AND CUPUASSU EXTRACT (<i>Theobroma grandiflorum</i> Shum)	30
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1. O KEFIR

1.1.1. Identificação e Obtenção do Kefir

O Kefir é um produto advindo da fermentação do leite, em que a hidrólise da lactose durante a fermentação ocorre com a ação simultânea de bactérias e leveduras contidas nos grãos de kefir (TOMISLAV *et al.*, 2013; BERGMANN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011.). Sua produção artesanal é baseada na tradição dos povos do Cáucaso, que segundo Leite *et al.*, 2013 se espalhou para outras partes do mundo, a partir do final do século 19, e hoje integra suas indicações nutricionais e terapêuticas para as escolhas alimentares diárias de várias populações.

Os grãos de kefir consistem de numerosas unidades de grãos pequenos (WANG *et al.*, 2011) os quais são caracterizados por uma estrutura globular oca com um diâmetro entre 2,0 e 9,0 mm (LU *et al.*, 2014) onde se pode observar uma rede de poliedro, formada principalmente pelas bactérias, na parede das unidades de grãos.

Figura 1 – Detalhes de uma amostra de kefir em grãos.



Fonte: O autor.

Há algumas variações na produção do Kefir, mas geralmente é fruto da fermentação do leite (LAUREYS *et al.*, 2014; TOMISLAV *et al.*, 2013; NIELSEN *et al.*, 2014). Em uma de suas variações pode se fazer a bebida conhecida como kefir de água, que simplesmente consiste de grãos de kefir fermentados em água. Laureys *et al.*, 2014 mostraram que a composição bactericida da bebida é em geral composta por: *Lactobacillus casei / paracasei*, *Lactobacillus harbinensis*, *hilgardii Lactobacillus*, *Bifidobacterium psychraerophilum / crudilactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, e *Dekkera bruxellensis*. Recentemente, tem sido usado como fermento para pão (MANTZOURANI, *et al.*, 2014) melhorando o processo de fermentação da massa.

Em seu trabalho sobre a formação de compostos bioquímicos voláteis a partir do queijo, MAGALHÃES *et al.*, 2011 investigaram o soro de queijo (CW) e soro de queijo desproteínizado (DCW) quanto à sua adequabilidade como novos substratos para a produção de bebidas (TOMISLAV *et al.*, 2013), como o kefir e demonstraram que os grãos de Kefir são capazes de utilizar a lactose dos queijos para produzir a bebida.

1.1.2. Atividades Terapêuticas e Farmacológicas do Kefir

O kefir é da família dos probióticos que segundo Bergmann *et al.*, 2010 são suplementos alimentares elaboradas com micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades apropriadas, ajudam o hospedeiro desenvolvendo um equilíbrio da microbiota intestinal (NIELSEN *et al.*, 2013), para manter a sua viabilidade e a atividade metabólica no intestino. (VERNA e LUCAK, 2010) mostraram que os probióticos são eficazes no tratamento da diarreia associada a antibióticos, atuando principalmente na recomposição da microbiota intestinal. Geralmente são encontrados em iogurtes e consumidos por humanos como controle da flora intestinal (BARBOSA *et al.*, 2013).

Nos Estados Unidos tem ganhado força como uma bebida probiótica saudável, principalmente como uma bebida artesanal, feita casa, mas também recentemente tem sido vendida como um produto comercial e já pode ser encontrada em estabelecimentos comerciais comuns (NIELSEN *et al.*, 2013).

O Brasil não tem o hábito da produção caseira nem da industrial (NIELSEN *et al.*, 2013), no entanto o potencial do Kefir frente a regulação do intestino tem chamado atenção de muita pessoas nesses últimos anos (GULITZ *et al.*, 2011).

No estudo de (GULITZ *et al.*, 2011) que envolveu água, grãos de kefir, figos secos e sacarose foram isoladas 453 tipos diferentes de bactérias, com predominância de Lactobacilos

(83% do total), o que demonstra a diversidade microbiana do Kefir já mencionada por (MAYRHOFER *et al.*, 2014) aliado a sua capacidade de produção de superfície agregadora de outras bactérias pela sua complexa formação de matriz (EPS) apontada por (KORHONEN *et al.*, 2010).

Em outro estudo (KESMEN *et al.*, 2011) encontrou 10 tipos diferentes de espécies bacterianas em grãos e bebidas de Kefir, mas com a mesma predominância de Lactobacilos encontrada por (GULITZ *et al.*, 2011). Isso indica que a diversidade na composição bacteriana dos grãos e das bebidas depende do contexto (GULITZ *et al.*, 2011) em que estão inseridos os experimentos.

Ertekin *et al.*, 2010 analisa que a bebida kefir pode ser feita tanto com água quanto com leite e estudou a produção de bebida com leite desnatado, onde demonstrou que a matriz bactericida do kefir não se altera com o fato de se usar leite integral ou leite desnatado.

Vários estudos demonstram que o kefir é ativo a uma variedade de doenças (BAKKEN, 2014; HO *et al.*, 2013). Muitos estudos têm demonstrado sua atividade antitumoral, como o de (TOLIOPOULOS *et al.*, 2012; CHEN, *et al.*, 2013; CHEN, *et al.*, 2015) que mostrou que o kefir tem ação citotóxica em células cancerígenas, anti-inflamatória, anti-neoplásico, pro-digestivas (HO *et al.*, 2013) e antiasmática (CHEN, *et al.*, 2013; CHEN, *et al.*, 2015). Por outro lado o Kefir também tem sido objeto de estudo no controle glicêmico e do colesterol. Ostadrahimi *et al.*, 2015 mostraram que probióticos do kefir apresentaram resultados altamente significativos no controle da glicose e do colesterol de pacientes com diabetes tipo 2 em comparação com pacientes que não administravam os probióticos.

Em um estudo sobre a influencia do Kefir sobre o metabolismo lipídico hepático de camundongos (CHEN, *et al.*, 2014) comprovou que o kefir melhorou o gasto energético e taxa metabólica basal através da inibição sérica das Transaminases de Glutamato Oxaloacetato (TGO) e Transaminase Glutamato Piruvato (TGP) de forma significativa diminuindo os Triglicerídeos e o Colesterol Total.

No trabalho de (FRIQUES *et al.*, 2015) sobre os efeitos do kefir probiótico na função cardiovascular em ratos espontaneamente hipertensos foi verificado que nos ratos que recebiam Kefir houve uma diminuição da pressão arterial em relação aos ratos que não recebiam Kefir. Segundo os autores isso expande os efeitos benéficos que o kefir pode propiciar.

Em outro estudo (CHEN *et al.*, 2015) mostrou que alguns ratos reponderam ao tratamento da osteoporose com a administração de kefir, pois nos ratos que receberam kefir houve um aumento na massa intracelular pela absorção de mais cálcio.

1.1.3 Microrganismos Presentes no Kefir

O kefir tem em sua composição várias bactérias (lactobacilos, lactococci, leuconostocs e acetobacteria) componentes da flora intestinal de humanos, assim, possui ação antimicrobiana (WENDLING e WESCHENFELDER, 2013; CARASI *et al.*, 2014).

Os lactobacilos têm especial atenção na ação antimicrobiana do kefir, conforme relatado por (MAYRHOFER *et al.*, 2014; KORHONEN *et al.*, 2010) eles integram de forma efetiva a flora intestinal, sendo ativos no controle de outras bactérias gram-positivas e gram-negativas. Muitas espécies de Lactobacilos e Lactococcus, segundo (KAJIKAWA e IGIMI, 2011) são seguros para consumo, porque eles são utilizados para a fermentação de alimentos a base de leite ou habitam a mucosa intestinal.

Muitos outros estudos tem citado que os lactobacilos aumentam a imunidade (ATIEH *et al.*, 2015) e já foram usados no estudo de obtenção de vacinas orais como o relatada por (STOEKER *et al.*, 2011) que estudou os *Lactobacilos gasseri* como um vector de vacina para a imunização contra agentes patogênicos da mucosa bucal e o relatado por (KAJIKAWA e IGIMI, 2011) que demonstraram que vacinas de lactobacilos podem eliminar a bactéria *Salmonella* de forma eficaz. Os lactobacilos inibiram *in vivo* a Ovalbimina no estudo de (HONG *et al.*, 2010) comprovando um potencial até nunca verificado, *in vivo*, do kefir: o antialérgico.

Em seu estudo sobre as propriedades lácticas das bactérias isoladas de grãos de Kefir (ZHENG *et al.*, 2013) verificou que três espécies de Lactobacilos encontradas se mostraram-se resistentes aos sais ácidos biliares, confirmando suas propriedades probióticas (BERGMANN *et al.*, 2010) e ainda foi confirmado que elas diminuem os níveis de colesterol total em ratos.

Outro componente encontrado no kefir são as leveduras (ATHANASIADIS *et al.*, 2001) que ajudam no processo de fermentação. A relação das leveduras com as bactérias presentes no Kefir são responsáveis pelo fortalecimento de uma superfície de agregação que se chama biofilme a ser formado pela relação simbiótica dos micro-organismos. Esse processo, segundo (VARDJAN *et al.*, 2013) estabelece o equilíbrio e a regulação dos grãos de kefir, onde em seu trabalho demonstrou que esse equilíbrio é bastante estável.

Embora as leveduras sejam bastante usadas no processo de fabricação de bebidas alcoólicas (GOLFINOPOULOS *et al.*, 2012), muitos trabalhos as ligam com processos biológicos comuns em alguns casos, como o do Kefir e produção de pães (PLESSAS *et al.*, 2012). O fato é que as leveduras propiciam o processo de crescimento dos grãos de kefir

(ROMANIN *et al.*, 2010), o que ajuda no processo de formação da superfície agregadora de outros microorganismos.

Gao *et al.*, 2012 isolou dois tipos de leveduras em grãos de kefir encontradas em diversas regiões do Tibet, quais sejam: *P. kudriavzevii* e *P. Guilliermondii*, sendo esta última pela primeira vez encontrada em Kefir tibetano. Esse fato reforça que ainda pode-se descobrir muito sobre a composição da flora dos Grãos de kefir, uma vez que as leveduras são associadas por diversos autores a formação da superfície agregadora nos grãos (GOLFINOPOULOS *et al.*, 2012; KORHONEN *et al.*, 2010; WANG, *et al.*, 2012) .

O curioso é que tanto as bactérias quanto os fungos necessitam de açúcar para se multiplicarem e crescerem (ROMANIN *et al.*, 2010; GOLFINOPOULOS *et al.*, 2012), respectivamente. Assim, a proliferação das bactérias do Kefir e o crescimento das leveduras esta condicionado a disponibilidade de açúcar (GOLFINOPOULOS *et al.*, 2012). Neste contexto, o grãos de Kefir podem permitir a formação de biofilmes (KORHONEN *et al.*, 2010; WANG, *et al.*, 2012).

1.2. BIOFILME

1.2.1. Definição e Formação de Biofilmes

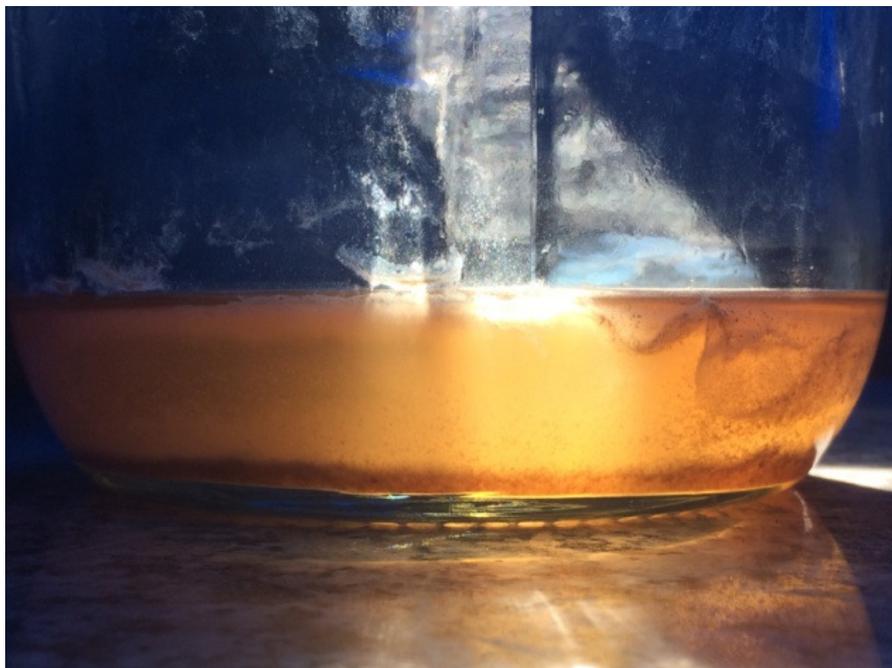
Um biofilme de kefir é um filme que contém uma microbiota associada com os grãos de kefir (WANG, *et al.*, 2012) . Muitas etapas ocorrem antes da formação do biofilme, como a fusão da variada microbiota para a fixação de outras células, e a adesão de outras ilhas de microbiotas que compõem um processo mais complexo de interação célula-célula, molécula-molécula, conforme argumenta (SIMOES *et al.*, 2010).

Os biofilmes se fundem através de uma matriz exopolissacarídea (EPS) (POLAK-BERECKA *et al.*, 2014; WANG, *et al.*, 2012) que possui influência sobre a agregação bacteriana, formação de biofilmes, adesão e sobrevivência (Lebeer *et al.*, 2009). (GÓRSKA-FRĄCZEK *et al.*, 2011) mostraram que a estrutura do polissacárido pode afectar a aderência bacteriana a mucosa intestinal. Porém alguns trabalhos mostram que a EPS melhora a adesão bacteriana (NIKOLIC *et al.*, 2012).

Uma vez formado o biofilme a sobrevivência dos micro-organismos torna-se viável (VU *et al.*, 2009) em sua superfície. Muitos trabalhos têm investigado a sobrevivência e adesão de lactobacilos a células de regiões sensíveis do corpo (UNDERHILL e ILIEV, 2014) mostrando que as bactérias necessitam de superfícies fixas para se depositar e poder se fundir em aglomerados de comunidades ainda maiores.

Os biofilmes estão presentes em nosso cotidiano (WANG, *et al.*, 2012) e podem ser benéficos ou maléficos saúde humana. Estudos recentes demonstram que uma gama de bactérias podem formar biofilmes como a *Escherichia coli*, que no trabalho de (SOLHEIM *et al.*, 2012) mostrou-se patogênica, formando biofilme na faixa de 20 a 30° C. As bactérias formam biofilmes pois possuem genes específicos que facilitam este processo (MASTROPAOLO *et al.*, 2012).

Figura 2 – Detalhes de uma amostra de biofilme (imagem em perfil) de kefir em crescimento. .



Fonte: O autor.

Ainda neste contexto (LEBEER *et al.*, 2007a, b) descrevem que há um certo número de genes presentes na microbiota de espécies de bactérias que são responsáveis pela aderência e formação dos biofilmes, embora considere que seja bastante complexo o processo. Na realidade as células e suas propriedades de superfície, em especial suas propriedades de auto-adesão são importantíssimas no processo de formação do biofilme (SIMOES *et al.*, 2010).

Kim, *et al.*, 2014 estudou o sistema simbiótico *Riptortus-Burkholderia* e averiguou que os genes *purN* de *E. coli* são responsáveis pela formação de biofilmes neste sistema simbiótico. Desta forma, os genes simbióticos são os responsáveis pela formação de biofilmes pelas bactérias (SOLHEIM *et al.*, 2012; AMOS *et al.*, 2011). Por outro lado, Sharma e Bearson, 2013 argumentam que embora os mecanismos moleculares que promovem a adesão

de *Escherichia coli* entero-hemorrágica nas células epiteliais estão bem caracterizados, os mecanismos reguladores que controlam a formação de biofilme não são completamente compreendidos, onde foi verificado que genes mutantes atrapalham a formação de biofilme, embora (CABAL et al., 2013) relacione também proteínas específicas a formação do biofilme. Isto pode estar relacionado ao fato de que a fusão de microorganismos *in vivo* não ser um evento normal (ISRAELACHVILI, 2011).

Para (KAY et al., 2011) a bactéria *Escherichia coli* é comum em ambientes médicos e pode se tornar patogênica caso venha a se proliferar com abundância. Nesses ambientes médicos, um controle deste vetor poderia ser feito com outros microorganismos por uma competição. Poderia ser controlada com o uso de outros biofilmes como é o caso do biofilme de kefir, já que os *Bacillus*, mesma classe dos *Lactobacillus* inibi o crescimento de outras bactérias (ZHUOYING, et al., 2012; ZHUOYING, et al., 2013).

Para (REUTER et al., 2010) o patógeno humano Microaerophilic *Campylobacter jejuni* é a principal causa de gastroenterite bacteriana, formando biofilme, transmitidas por alimentos no mundo desenvolvido e não há um mecanismo não degradante da flora intestinal de controle deste patógeno. No entanto muitos estudos indicam que o Kefir pode controlar a flora intestinal (KESMEN et al., 2011), atuando na inibição de outros microorganismos nocivos a saúde humana (GULITZ et al., 2011) uma vez que integram sua composição outros microrganismos que beneficiam o corpo humano e podem competir por espaço e energia..

Provavelmente no processo de formação do biofilme as bactérias tenham uma grande contribuição, já que são elas que propiciam a simbiose característica dos grãos de kefir. Em estudo recente, (POLAK-BERECKA et al., 2014) usaram microscopia eletrônica de transmissão para demonstrar que os *Lactobacilos rhamnosus*, obtidos a partir do trato intestinal humano, possuem alta capacidade de adesão e agregação a células intestinais.

Entender a formação do biofilme pode facilitar a compreensão dos mecanismos de agregação das bactérias em sua superfície. Sabe-se que a superfície sólida que permite a agregação de adesão de bactérias inicia-se com o processo de bioincrustação (MORADI, et al., 2016; KIM et al., 2011) onde a taxa de fixação bactéria e de formação de biofilme varia conforme a espécie de bactéria. Por outro lado Kim et al., 2011 argumenta que alguns parâmetros físico químicos como o pH, temperatura e a umidade relativa são fundamentais no processo de formação da superfície agregadora de micro-organismos.

1.2.2. Biofilmes de Kefir

Os grãos de Kefir possuem uma gama de bactérias lácticas que são benéficas a saúde humana (TOMISLAV *et al.*, 2013; BERGMANN *et al.*, 2010). O corpo humano possui inúmeras bactérias e dentre elas temos a *Staphylococcus aureus* que é comum na pele, mas pode ser patogênica quando consegue alcançar a corrente sanguínea e esta associada a algumas infecções, a proliferação das espinhas e formação de biofilme (MOORMEIER, *et al.*, 2013). Neste sentido o biofilme a base de kefir, uma vez composto de microorganismos benéficos ao homem, poderia controlar a comunidade desta bactéria sendo um protetor antibactericida, atuando na inibição desta.

Zhuoying, *et al.*, 2012 mostrou que bactérias do gênero *Bacillus* podem inibir a formação de biofilmes, emitindo um amplo espectro formado por compostos inibitórios (ZHUOYING, *et al.*, 2013), formando outro biofilme, sendo este protetor. Este fato é importante, pois os biofilmes de kefir contêm bactérias benéficas à saúde humana (ZHUOYING, *et al.*, 2013; UNDERHILL e ILIEV, 2014; SEBASTIÃO *et al.*, 2013) e o biofilme de Kefir pode também atuar como um protetor antibactericida.

A formação de biofilme é importante na etapa de defesa quanto a patogenicidade de microorganismos (WANG, *et al.*, 2012) pois fornece proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, principalmente bacterias gram-positivas (SEBASTIÃO *et al.*, 2013) como as encontradas nos graos de kefir. No processo de formação do Biofilme também vale resslatar que algumas bacterias que produzem a matriz polimerica (WANG, *et al.*, 2012; SEBASTIÃO *et al.*, 2013) também podem compor a sua superfície, que em geral é formada por bactérias de vida livre.

Os Biofilmes (membranas) de kefir podem ser obtidos através da incubação de certa quantidade de grãos de kefir inoculados em leite bovino mantidos a uma temperatura de 37° por até 18 horas (ALMEIDA e LIMA, 2013; MAGALHÃES, 2008) ou mesmo inoculado em solução aquosa de açúcar mascavo (MAGALHÃES, 2008). Nesta pesquisa os biofilmes foram produzidos com solução de água e açúcar mascavo e obtidos junto ao Laboratório de pesquisa em fármacos da Universidade Federal do Amapá.

1.3. O CUPUAÇU

1.3.1. Identificação e Uso do Cupuaçu

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Shum) é uma espécie nativa da região amazônica, diploide, membro da Sterculiaceae e é comumente relacionada ao cacau (*Theobroma cacao* L.). Possui forma de drupa com um forte cheiro agradável; contém em

geral de 25-50 sementes sobrepostas em cinco linhas sobreposta (SALGADO, *et al.*, 2011; SALGADO *et al.*, 2012).

Muitos tipos de iguarias são feitas a partir da polpa, que é conhecido pelo sabor forte (VRIESMANN *et al.*, 2010; SALGADO *et al.*, 2012). Várias empresas na Amazônia estão exportando a polpa congelada para outros países, além de ser objeto de inúmeras pesquisas tendo em vista seu potencial nutracêutico.

1.3.2. Atividades Terapêuticas Cupuaçu

Muitos estudos têm revelado à capacidade benéfica do Cupuaçu a saúde humana (CEBALLOS e VILLARREAL, 2011; SALGADO, *et al.*, 2011; PUGLIESE *et al.* 2013). Os pesquisadores (OLIVEIRA E GENOVESE, 2013) comprovaram que o licor de Cupuaçu expandiu a capacidade antioxidante em ratos, embora ainda não seja comparado com seu irmão o Cacau em quantidade de flavonoides.

Em touros da raça Nelore (MOTA *et al.*, 2014) mostrou que houve uma melhor digestibilidade dos alimentos ingeridos pelos touros quando administrados bolos de Cupuaçu como complemento da dieta, mostrando que o Cupuaçu pode atuar regulando a digestão desses animais tendo em vista seu caráter fibroso (VRIESMANN *et al.*, 2010; SALGADO *et al.*, 2012) e ácido (SALGADO *et al.*, 2012).

1.3.3. Atividade antioxidante do Cupuaçu

Para a indústria de alimentos, produtos provenientes de cupuaçu devem possuir propriedades que melhorem a sua funcionalidade (SALGADO, *et al.*, 2012), assim como o acréscimo em seus componentes bioativos, principalmente antioxidantes (PUGLIESE *et al.* 2013). Antioxidantes, em resumo, são substâncias que atuam inibindo e/ou diminuindo efeitos desencadeados pelos radicais livres (CEBALLOS e VILLARREAL, 2011), podendo ser definidos como compostos que protegem as células frente os efeitos prejudiciais dos radicais livres (SALGADO, *et al.*, 2011) oxigenados e nitrogenados, desenvolvidos nos processos oxidativos. O cupuaçu embora se destaque pelo seu potencial antioxidante possui, ainda que em menor quantidade: ácido ascórbico, flavonóides, e proantocianidinas (PUGLIESE *et al.* 2013).

Santos *et al.* (2010) mostrou que os potenciais antioxidantes dos produtos de cupuaçu de seu estudo variaram de 1,11 a 1,57 μM de Trolox g^{-1} de peso fresco e em atividade antioxidante equivalente à vitamina C (VEAC) de 14,33 a 36,14 mg de ácido ascórbico em 100 g^{-1} de peso fresco. Em conclusão, aquele estudo mostrou que os valores de antioxidantes

foram baixos quando comparados com outras frutas, como a graviola e o açaí, avaliadas por Kuskoski *et al.* (2005). Ainda assim, o mesmo autor argumenta que os valores reduzidos podem estar relacionados a processos de armazenamento dos produtos bem como há dependência de solos e modo de cultivo (PUGLIESE *et al* 2013) ou esse fato esteja relacionado a sua forma de plantio e um melhoramento genético poderia melhorar a qualidade da fruta (ALVES *et al.*, 2003).

Há muitas hipóteses para a diminuição da capacidade antioxidante do Cupuaçu (PUGLIESE *et al* 2013; ALVES *et al.*, 2003), pois muitos são os fatores que podem levar a um mau aproveitamento da fruta, em face disso (CARVALHO *et al.*, 2015) relata que algumas técnicas de conservação pós-colheita são empregadas na diminuição da atividade metabólica dos frutos, principalmente, a taxa respiratória e a perda de água, com intuito de manter por mais tempo sua qualidade pós-colheita. Cita também que, o armazenamento refrigerado e o pré-resfriamento são algumas dessas técnicas, podendo ser utilizados de forma isolada ou combinados.

Figura 3 – Detalhes de uma amostra de biofilme de kefir com Cupuaçu em crescimento.



Fonte: O autor.

Neste trabalho o extrato de cupuaçu foi inserido no biofilme de kefir a fim de avaliar diferenças e semelhanças nas suas características superficiais em relação aos

biofilmes que só continham kefir, pois se conservarmos a ideia de que, ainda que pequeno, haja potencial antioxidante pode-se produzir biofilmes com propriedades antioxidantes com ou sem modificações na estrutura superficial do biofilme de kefir. Assim, resguardadas as propriedades de cicatrização frente à atividade antioxidante do cupuaçu os biofilmes adesivos podem ser usados como biocurativos naturais.

1.4. O AÇAÍ

1.4.1. Identificação e Uso do Açaí

O gênero *Euterpe* tem cerca de 28 espécies localizadas na América do Sul e Central e distribuídos por toda a bacia amazônica (YAMAGUCHI *et al.*, 2015). As três espécies que ocorrem mais frequentemente são *E. oleracea*, *E. precatoria* e *Euterpe edulis* (HOLDERNESS *et al.*, 2011; YAMAGUCHI *et al.*, 2015). Porém, apenas as duas primeiras espécies têm suas frutas usadas de forma comercial (HEINRICH *et al.*, 2011).

O Brasil, com destaque para região norte, segundo Portinho *et al.*, (2012) é o maior produtor, consumidor e exportador. Entre os estados produtores de açaí, Pará, Maranhão, Amapá, Acre e Rondônia são os mais valorizados pelo plantio e colheita do fruto, com o primeiro, incumbente de 95% da produção de açaí, determinada em 100 a 180 mil litros/dia na capital paraense (PORTINHO *et al.*, 2012). O mercado desta iguaria já esta se expandindo e já abrange o sudeste do país e alguns países da Europa, Estados Unidos, Japão e China (YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

1.4.2. Atividades Terapêuticas e Farmacológicas do Açaí

No Brasil, o Açaí tem sido usado, tendo em vista seu potencial antioxidante (RANER *et al.*, 2015), sendo usado para o tratamento de complicações de pele, distúrbios digestivos e infecções parasitárias e nos últimos anos tem sido amplamente divulgado, por exemplo, através da Internet (PORTINHO *et al.*, 2012).

O efeito da polpa de açaí em fatores de risco para distúrbios metabólicos em indivíduos com excesso de peso foi estudado por (UDANI *et al.*, 2011), tendo em vista seu potencial funcional (PORTINHO *et al.*, 2012) onde foi demonstrado que a administração da polpa diminui os efeitos do metabolismo relacionado a esses indivíduos.

O Açaí tem sido investigado tendo em vista ser um alimento nutracêutico tendo em vista seu rico teor de antocianinas (AMSELLEM-LAUFER, 2015; RANER *et al.*, 2015), pigmentos hidrossolúveis que designam a cor avermelhada do fruto (KANG *et al.*, 2011; HOLDERNESS *et al.*, 2011; HEINRICH *et al.*, 2011; PORTINHO *et al.*, 2012; UDANI *et*

al., 2011). Esses pigmentos são conhecidos por suas diversas características, quais sejam: farmacológicas, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana, se antecipando a oxidação de proteínas de baixa densidade (LDL) (YAMAGUCHI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2011)., enfermidades cardiovasculares e doenças neurológicas (KANG *et al.*, 2011).

As frutas em geral possuem um potencial de controle de inúmeras doenças principalmente aquelas com presença de substâncias antioxidantes dentre as quais o Açaí se inclui (MALCHER, 2011). A atividade bioativa tem sido objeto de pesquisas frente ao seu poder de regeneração do tecido epitelial por sua ação antioxidante, hidratante, reguladora de lipídeos (UDANI *et al.*, 2011) e estimulante do processo de cicatrização (MACHADO, 2010;).

Por outro lado muitas dúvidas cercam a rela capacidade de cura ou alívio de sintomas de doenças com o uso prolongado de Açaí (LIAO *et al.*, 2013; UDANI *et al.*, 2011). O que se sabe é que as antocianinas e os flavonoides presentes no açaí retardam o envelhecimento (PORTINHO *et al.*, 2012) e atuam na restauração de tecidos (KANG *et al.*, 2011; HOLDERNESS *et al.*, 2011).

Portinho *et al.*, 2012 afirma que estudos *in vitro* demonstraram que as frações polifenólicas da polpa do açaí reduz a proliferação das células leucêmicas HL-60 provavelmente através da apoptose da caspase-3 ativada, além de elencar que estudos clínicos começam a demonstrar que os compostos polifenólicos possuem efeitos benéficos na diminuição dos riscos de obesidade associada a doenças crônicas como diabetes tipo 2 (UDANI *et al.*, 2011).

Figura 4 – Detalhes de uma amostra de biofilme kefir com Açaí em crescimento.



Fonte: O autor.

Nesta pesquisa o extrato de Açáí foi inserido no ensaio do biofilme de kefir a fim de avaliar diferenças e semelhanças nas suas características superficiais em relação aos biofilmes que só continham kefir, pois como possui um grande potencial antioxidante podem-se produzir biofilmes com propriedades antioxidantes com ou sem modificações na estrutura superficial do biofilme de kefir. Assim, resguardadas as propriedades de cicatrização frente à atividade antioxidante do Açáí os biofilmes adesivos podem ser usados como biocurativos naturais, inclusive mais eficazes que os de Cupuaçu.

1.5. PARAMETROS DE ANÁLISE SUPERFICIAL DE BIOFILMES

1.5.1. Rugosidade Superficial

Segundo Hutchings (1992), rugosidade são irregularidades em escalas pequenas de uma superfície.

A rugosidade média é talvez o conceito mais antigo em uso. A facilidade de cálculo explica por si só seu uso. Este conceito pode ser entendido como o desvio médio de um perfil de sua linha média. É descrito matematicamente na forma conforme (GHASEMLOU *et al.*, 2011):

$$S_a = \int \int_a |Z(x, y)| . dx . dy , \quad 1$$

onde Z é a função altura da área.

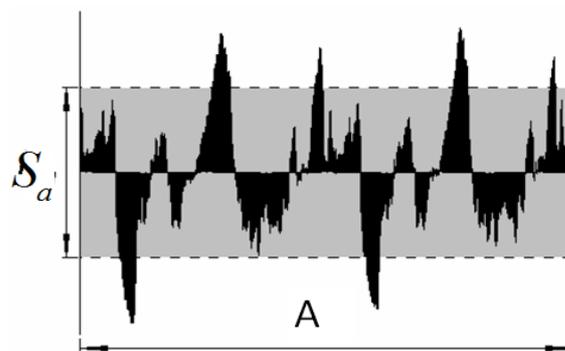


Figura 6 – Ilustração dos parâmetros de rugosidade média. Fonte: autor

Outro parâmetro importante a citar é o da raiz quadrática média (RMS) da rugosidade que corresponde a:

$$S_q = \sqrt{\int \int_a |Z(x, y)|^2 . dx . dy} . \quad 2$$

Ainda é importante citar o S_{dq} que é o gradiente da raiz quadrática média que define a inclinação para cada ponto de área excluindo ponto na borda e pode ser determinado por:

$$S_{dq} = \sqrt{\frac{1}{A} \int_0^x \int_0^y \left(\left(\frac{\partial Z(x, y)}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial Z(x, y)}{\partial y} \right)^2 \right) dx dy}$$

3

1.5.2. Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica AFM tem sido muito usada para estudar superfícies coloidais (DUCKER et al., 1991) e polímeros (HERRMANN *et al.*, 1997). Para Pinto *et al.*, 2013 as principais vantagens do AFM, em relação a outras técnicas são: maior resolução, imagens em 3 dimensões, não requer métodos específicos de preparação da amostra, permite a quantificação direta da rugosidade da amostra, permite a medida da espessura de filmes ultrafinos sobre substratos e análise por fractal.



Figura 7 – AFM/STM modelo *Easyscan2* do fabricante nanosurf usado neste trabalho. Fonte: Pinto *et al.*, 2013.

Nesta técnica, o funcionamento está baseado na interação que ocorre, ao longo da varredura, entre os átomos que compõem a ponta do cantilever do microscópio e os átomos que compõem a superfície da amostra (PINTO *et al.*, 2013).

Segundo Herrmann *et al.*, 1997 a deflexão no cantilever causada pela interação da sua ponta com a amostra pode ser medida por um sistema ótico, com feixe a laser e um fotodetector, que determinam o quanto o cantilever deflete devido a topografia da amostra. Assim, ainda de acordo com Herrmann *et al.*, 1997 com os dados da deflexão do cantilever nos eixos x, y e z, reconstrói-se a imagem por intermédio de um software.

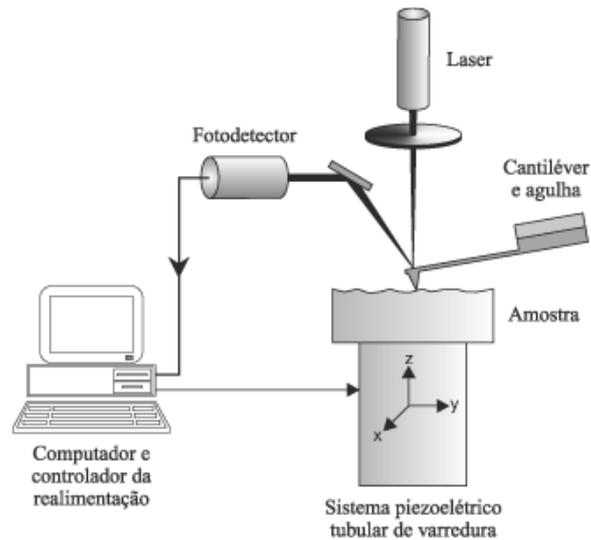


Figura 8 – Ilustração do funcionamento do AFM. Fonte: Hermann *et al.*, 1997.

O AFM pode obter imagens na escala nano, inclusive, com detalhes microestruturais da amostra usando as imagens de deflexão (MARTIN *et al.*, 1987). Neste trabalho, as sondagens foram realizadas, sob condições ambientes (umidade relativa de 51%), em um microscópio de força atômica (AFM) da marca *nanosurf*, modelo *easyScan 2 controler* em modo contato, com cantilever de silício *ContAL-G*, com frequência de ressonância de 13 kHz e constante elástica de 0,2 N/m, operando no modo contato em uma região de análise com comprimento 30 μm , em uma razão de varredura 0,7 segundos por linha, com força de contato de 17,2 nN.

Nesta pesquisa o AFM foi usado para obter imagens topográficas das superfícies dos biofilmes para a caracterização superficial pelo parâmetro de rugosidade superficial e análise da entropia da topografia.

1.5.3. Difratometria de Raios-X - DRX

A Difratometria de Raios-X (DRX) é uma técnica de caracterização de estruturas cristalinas bastante difundida e largamente utilizada (FILHO e LOPES, 2013; LI e CHANG, 2004). Segundo Filho e Lopes (2013), se uma onda atravessa uma região onde tenham barreiras de tamanho semelhante ao do comprimento de onda da radiação, há um espalhamento, que se denomina difração.

Basicamente, os raios X ao incidirem sobre um material podem ser espalhados de forma elástica com dispersão ou espalhamento coerente. Na ocasião o fóton de raios X depois

da colisão com o elétron tem sua trajetória mudada, contudo sua fase e energia do fóton incidente permanecem inalteradas, o que para a física ondulatória significa dizer que a onda eletromagnética é absorvida rapidamente pelo elétron e emitida novamente, sendo o elétron o centro de emissão de raios X.

Matematicamente pode-se determinar a diferença de caminho óptico entre dois raios-X na seguinte forma:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta \quad 4$$

onde, n é um número inteiro λ é o comprimento de onda da radiação incidente d é a distância interplanar e θ é o ângulo de incidência em relação ao plano considerado. Esta equação é conhecida como lei de Bragg (ALBERS *et al.*, 2002).

Esta técnica é muito usada na identificação da estrutura e composição química de substância cristalina e amorfa (RADMILOVIC *et al.*, 1995). Morgan e Paganin, 2012 mostraram que em alguns casos é possível determinar com até 95% de certeza a estrutura cristalina de alguns compostos com diversificação atômica.

Estudos recentes como o de (BOVENKAMP *et al.*, 2013) têm demonstrado que é possível identificar a estrutura cristalina de organismos vivos como as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*.

Nesta pesquisa esta técnica foi utilizada para determinar a influência do kefir, do extrato de açaí e do extrato de cupuaçu na estrutura cristalina dos biofilmes para entender como se modifica a superfície dos biofilmes na presença desses agregados.

1.5.4. Homogeneidade Superficial

A análise de superfícies por métodos numéricos tem crescido nos últimos anos. Contudo, caracterizar uma superfície com esses métodos exige um grande esforço computacional (FIGUEIREDO, 2015) que depende da elaboração de ferramentas matemáticas específicas neste processo. Por outro lado ao final da década passada houve muito avanço neste aspecto levando em consideração que a informática tem evoluído constantemente.

Na física estatística a desordem de um sistema está relacionada, não diretamente, mas perante uma função logarítmica (EL-SAYED, 2011) com o número de microestados acessíveis ao sistema uma vez respeitadas as restrições contra a ele (SALINAS, 1997). Neste caso, tais restrições para sistemas termodinâmicos ligam-se à energia interna U e ao volume V postas ao sistema (JAYNES, 1979; GIBBS, 1902), e aumentar a desordem de um sistema

representa aumentar o número de microestados (de configurações) acessíveis às partículas deste sistema.

A principal ferramenta de análise da uniformidade topográfica é a entropia de Shannon (EL-SAYED, 2011) que mapeia a distribuição de alturas ao longo do perfil vertical de uma superfície. Settin *et al.*, 2007 mostrou que associada a outras técnicas pode redesenhar superfícies em três dimensões.

Matematicamente pode-se associar o valor estatístico de S a distribuição de picos na topografia de uma superfície (FIGUEIREDO, 2015) da seguinte forma:

$$S = -\sum p \log p, \quad 5$$

onde S é a entropia do sistema e p é a probabilidade associada a distribuição de probabilidades devidas a informação. Segundo essa equação quanto menos informação se obtém do sistema maior será sua entropia.

Nesta pesquisa o conceito de entropia foi usado para explicar que quando a desordem na superfície dos biofilmes aumenta, no caso em que foi feita a medição da entropia superficial, por simulação numérica, maior é a entropia, o que leva esse sistema ao equilíbrio termodinâmico. Neste caso, quanto maior a entropia superficial maior será a uniformidade da superfície, o que nos leva a deduzir que numa perspectiva de aplicação desses biofilmes resguardada e claro as ações terapêuticas de seus agentes, por exemplo, no tratamento da cicatrização de feridas seja garantida a adesividade máxima dos biofilmes.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar e analisar a superfície de biofilmes de kefir associados ao extrato de Açaí e ao extrato de Cupuaçu como indicadores de adesividade superficial, com o uso de técnicas experimentais e homogeneidade superficial.

2.2 . OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter biofilmes de kefir, kefir associado ao extrato de Cupuaçu e Kefir associado ao extrato de Açaí em diferentes concentrações;
- b) Obter imagens topográficas das superfícies dos biofilmes formados por Microscopia de Força Atômica (AFM);
- c) Estudar a dependência da rugosidade com a concentração de Kefir, concentração de Açaí e concentração de Cupuaçu.
- d) Comparar as características superficiais dos biofilmes, determinando as diferenças e semelhanças das estruturas e parâmetros obtidos;
- e) Determinar a influência do Kefir, do extrato de Açaí e do extrato de Cupuaçu na estrutura cristalina dos biofilmes;
- f) Obter e analisar a entropia da topografia dos biofilmes a partir da matriz de alturas das imagens geradas pela Microscopia de Força Atômica via simulação computacional;

3 CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DE BIOFILMES DE KEFIR ASSOCIADO AO EXTRATO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E EXTRATO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Shum) (SUPERFICIAL CHARACTERISATION OF KEFIR BIOFILMS ASSOCIATE TO AÇAÍ EXTRACT (*Euterpe oleracea* Mart.) AND CUPUASSU EXTRACT (*Theobroma grandiflorum* Shum))

(Artigo submetido à revista *Applied Surface Science*)

Caracterização Superficial de Biofilmes de Kefir associado ao extrato de Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Shum)

Matos, R.S.¹; Carvalho, J.C.T²; Oliveira, A.F²; Pinto, E.P¹; Figueiredo S.S¹; Zamora, R.R.M¹;

¹ *Laboratório de Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Amapá, Macapá, AP, Brasil*

² *Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Universidade Federal do Amapá, Macapá, AP, Brasil*

Email: robert_fisic@unifap.br

Neste estudo foi realizada a caracterização superficial de biofilmes de kefir, kefir com extrato de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Shum) e kefir com extrato de Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) obtidos a partir da inoculação de grãos de kefir em solução de açúcar mascavo. Foram realizados quatro ensaios para obtenção dos biofilmes; nestes obtiveram-se biofilmes sem Kefir, biofilmes de Kefir, biofilmes de Kefir com extrato de Cupuaçu e biofilmes de kefir com extrato de Açaí. A cristalinidade dos biofilmes foi analisada utilizando difração de raios-X (DRX); Esta revelou uma estrutura amorfa-cristalina. Estes resultados foram explicados pela microestrutura do biofilme, que foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM), demonstrando uma dependência crescente da rugosidade com a concentração de substrato, principalmente, para os biofilmes de Cupuaçu e Açaí. A homogeneidade da superfície dos biofilmes foi determinada; Esta revelou que todos os biofilmes têm distribuição uniforme de alturas na superfície. A pesquisa mostrou que as superfícies dos biofilmes de kefir, kefir com extrato de Cupuaçu e kefir com extrato de Açaí caracterizam-se por amorficidade, não existindo grandes picos associados a estruturas cristalinas; alta rugosidade indicando que os biofilmes possuem boa adesividade e uniformidade na distribuição dos picos superficiais, apontando que uma vez aderidos a uma superfície não haverá formação de bolhas em sua superfície. Assim, em uma perspectiva de aplicação na indústria farmacêutica os biofilmes podem ser usados como curativos naturais.

Palavras chave: Biofilmes, Kefir, Açaí, Cupuaçu, Adesividade.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil das últimas cinco décadas tem dado muita atenção ao setor agropecuário (Homma e

Frazão, 2002), haja vista sua vinculação a exportação de produtos derivados dessa atividade econômica. Com a intensificação desta atividade

Navarro (2001) argumenta que outras preocupações surgiram quebrando uma autonomia relativa deste setor, quais sejam: preservação do meio ambiente, mudanças climáticas, desenvolvimento sustentável, aumento da demanda de alimentos, aspectos nutricionais, utilização de agrotóxicos, dentre tantos outros. Em atenção a essas preocupações a indústria farmacêutica se movimentou ainda mais na formulação de fármacos a base de produtos naturais (Filho e Yunes, 1998) (fitoterápicos) que fornecesse uma alternativa a sociedade frente aos fármacos sintéticos numa perspectiva de uso sustentável dos recursos naturais (Junior; Bolzani, 2006).

O Kefir é uma bebida proveniente da fermentação do leite, ácida e de baixo teor alcoólico (Lopitzotsoa, *et. al*, 2006). Obtido na temperatura ambiente é metabolizado, de acordo com Semih e Cagindi (2006) por uma mistura complexa de bactérias (incluindo as várias espécies de lactobacilos, lactococci, leuconostocs e acetobacteria) e leveduras que formam os grãos de kefir. Muitos estudos têm estudado sua atividade antitumoral, (Furukawa *et al.*, 1991) e antimicrobiana *in vitro* contra uma extensa variedade de bactérias gram-positiva e gram-negativas e contra alguns fungos (Cevikbas *et al.*, 1994).

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Shum) é uma espécie originária da região amazônica (Cohen e Jackix, 2004; Lannes, 2003). A fruta possui antioxidantes que em resumo, são substâncias que atuam inibindo e/ou diminuindo efeitos desencadeados pelos radicais livres (Soares et al., 2005). Santos *et al* (2010) mostrou que os valores de antioxidantes de cupuaçu são baixos quando comparados com outras frutas, como a graviola e o

açai, avaliadas por Kuskoski *et al.* (2005), mesmo assim argumenta que isto pode estar relacionado a forma de armazenamento da fruta pós colheita.

O açai, fruto da planta açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) que é a palmeira mais produtiva da região amazônica (Menezes *et al.*, 2008) é o subsídio para a obtenção do vinho de açai, que segundo Menezes et al (2008) é bebida símbolo do estado do Pará-Brasil. O Açai tem sido investigado em razão de seu valor nutritivo e sensorial (Rogez, 2000; Souto, 2001; Menezes, 2005), sendo um alimento nutracêutico tendo em vista seu rico teor de antocianinas, pigmentos hidrossolúveis que designam a cor avermelhada do fruto (Iaderoza *et al.*, 1992; Ozela *et al.*, 1997; Bobbio et al., 2000; Menezes, 2005). Esses pigmentos são conhecidos por suas diversas características, quais sejam: farmacológicas, anticarcinogênica, antiinflamatória e antimicrobiana, se antecipando a oxidação de proteínas de baixa densidade (LDL), enfermidades cardiovasculares e doenças neurológicas (Kuskoski *et al.*, 2002; Alasalvar *et al.*, 2005). A atividade bioativa do açai tem sido objeto de pesquisas frente ao seu poder de regeneração do tecido epitelial por sua ação antioxidante, hidratante, reguladora de lipídeos e estimulante do processo de cicatrização (Machado, 2010). Recentemente (Domingues, *et. al.*, 2012), mostrou que os pigmentos antociânicos do açai podem ser usados como evidenciadores de biofilme dental.

Os Biofilmes são constituídos por uma comunidade de células bacterianas fundidas em por uma matriz exopolissacarídea (EPS) feitas com as mesmas células aderidas e, uma superfície

abiótica ou biótica (Dunne, 2002; Rigano *et al.*, 2007). A fusão a superfícies inertes acontece por fatores tais como: interação de van der Waals (Marshall *et al.*, 1971), eletrostáticas e forças de hidrofobicidade, no caso das bactérias depende das estruturas moleculares intrínsecas da superfície da célula tais como os flagelos (Chmielewsky e Frank, 2006; Dunne, 2002; Pan *et al.*, 2006; Tresse *et al.*, 2007). Os Biofilmes (membranas) de kefir podem ser obtidos através da incubação de certa quantidade de grãos de kefir inoculados em solução aquosa de açúcar mascavo (Magalhães, 2008). Na indústria alimentícia têm sido usado para revestimento de alimentos (Ghasemlou *et al.*, 2011) e na indústria farmacêutica muitos estudos tem avaliado seu efeito antibactericida (Carvalho, 2011).

O uso de técnicas experimentais tem sido muito usado em estudos de superfície de polímeros (Herrmann *et al.*, 1997). A Microscopia de força Atômica (AFM) tem sido bastante usada para obter imagens de topografia de alta resolução na escala atômica, para a caracterização de superfícies (Herrmann *et al.*, 1997). Complementa esta técnica a entropia de superfícies (Figueiredo, 2015), que mapeia a uniformidade da topografia e adesão da amostra.

A obtenção das análises de rugosidade por AFM, e homogeneidade superficial das membranas, explicará se os biofilmes de kefir, kefir com açaí e kefir com cupuaçu apresentam mudança topográfica significativa. A caracterização da microestrutura dos biofilmes por DXR poderá ratificar tal comportamento, uma vez que são técnicas que desvendam detalhes microestruturais de superfícies. Assim, tendo em vista a corrida da

indústria farmacêutica por produtos naturais com impacto terapêutico e ressaltando que o Kefir já possui comprovada atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral (Maeda *et al.* 2006), o açaí com suas propriedades antioxidantes (Portinho *et al.*, 2012) e o cupuaçu também com suas propriedades antioxidantes (Santos *et al.* 2010) podemos analisar o comportamento da superfície desses biofilmes com potenciais antibacterianos e antioxidantes.

Dessa forma, se há mudança na topografia no sentido de aumento da rugosidade com a concentração do biofilme outros parâmetros (como a adesividade) mudam e esse biofilme possa ser usado como um curativo natural, investigada é claro a interação deste biofilme com a pele, pois apesar de existirem mais de 2000 substâncias utilizadas como curativos (Yaguishta, 2006), pesquisas de novos agentes cicatrizantes tem sido constante.

Neste trabalho serão produzidos biofilmes a partir de água destilada, açúcar mascavo, grãos de kefir, polpa de Açaí e polpa de Cupuaçu. Em trabalho recente Ghasemlou, Khodaiyan e Oromiehie (2011) compararam biofilmes de Kefirano (substância extraída de grãos de kefir) puro, com biofilmes de kefirano com plastificantes como o Glicerol, Sorbitol e Ácidos Oléicos (Ácidos Graxos) a fim de encontrar um biofilme que apresente um menor padrão de rugosidade possível em comparação com o biofilme de kefirano puro, cuja característica principal é apresentar padrões hidrofílicos que inviabilizam seu uso na indústria de alimentos. Assim como no caso acima, respeitada e claro sua finalidade, comparar-se-á biofilmes

produzidos sem kefir, com kefir, kefir com açaí e kefir com cupuaçu, para avaliação das propriedades importantes da superfície desses biofilmes que levem a uma aplicação na indústria farmacêutica.

É salutar lembrar que a indústria farmacêutica tem estimulado nos últimos anos o uso de produtos naturais na formulação farmacológica de medicamentos, o que nos leva a buscar de forma curiosa cada vez mais mecanismos que possibilitem o uso sustentável dos recursos naturais e direcionados a cura de enfermidades ou comodidade das pessoas. Os biofilmes de kefir inserem neste contexto por serem provenientes de um recurso natural e que por apresentar um potencial terapêutico, conforme argumentado acima nos estimula a estudar suas características superficiais para uma perspectiva farmacêutica.

Conforme mencionado, vários trabalhos evidenciam e demonstram as propriedades terapêuticas do kefir (Maeda *et al.*, 2006), bem como dos biofilmes que podem ser formados a base de kefir. As junções dessas propriedades terapêuticas com os antioxidantes do açaí e do cupuaçu (Portinho *et al.*, 2012) seriam, então, a nata de uma evolução na indústria farmacêutica no que tange a produção de biopolímeros de origem natural que se apresentam ativos na cicatrização (efeito gerado pela ação de antioxidantes, com reparação dos tecidos) de feridas (Machado, 2010), por exemplo, demonstrada é claro que suas características superficiais apontem nesse norte.

Os cálculos de rugosidade e homogeneidade superficial podem mostrar se há um grande potencial dos biofilmes, como possíveis biocurativos no tratamento de enfermidades da pele. Contudo, pode-se não encontrar tais

características que levem a este entendimento, por isso um estudo cauteloso foi desenvolvido ao longo deste trabalho.

Assim, o objetivo desse estudo é caracterizar e analisar a superfície de biofilmes de kefir associado ao extrato de Açaí e ao extrato de Cupuaçu como indicadores de adesividade superficial, com o uso de técnicas experimentais e homogeneidade superficial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os grãos de Kefir utilizados neste estudo foram obtidos junto ao Laboratório de Pesquisa em Fármacos da Universidade Federal do Amapá. Os grãos foram mantidos refrigerados para conservação e posterior inoculação em solução de açúcar mascavo. As polpas de açaí e cupuaçu foram obtidas em estabelecimentos comerciais, filiados ao Serviço Brasileiro de Apoio as Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), da cidade de Macapá no estado do Amapá-Brasil.

2.1. Obtenção dos biofilmes

Os biofilmes foram obtidos em quatro ensaios: filmes sem Kefir, biofilmes somente com Kefir em solução de açúcar mascavo, biofilmes com Kefir em solução de açúcar mascavo e extrato de cupuaçu e biofilmes com Kefir em solução de açúcar mascavo e extrato de Açaí. Todos os biofilmes foram obtidos no Laboratório de Pesquisa em Fármacos da Universidade Federal do Amapá, no período de janeiro a dezembro de 2014.

O primeiro consistiu em produzir filmes (três para cada concentração) em solução de água destilada e açúcar mascavo, cuja concentração (40 g/L) foi pesada em balança digital de precisão, como controle do experimento.

O próximo foi realizado com solução de água destilada e açúcar mascavo 40 g/L (medida constante para todos os experimentos desse ensaio) cujas concentrações foram pesadas em balança digital de precisão, onde inocularam-se concentrações de 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L e 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de grãos de kefir em 1000 mL de solução de açúcar mascavo em água destilada, também pesados em balança digital de precisão, em frascos com capacidade de 3000 mL sendo 3 frascos para cada concentração.

O terceiro foi realizado com concentrações de 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de extrato de polpa comercial de cupuaçu, pesadas em balança digital de precisão, onde foram inoculadas concentrações de 40 g/L de grãos de kefir em 1000 mL de solução de açúcar mascavo (40g/L) em água destilada com as concentrações de extrato de cupuaçu, também pesados em balança digital de precisão, em frascos com capacidade de 3000 mL sendo 3 frascos para cada concentração.

O quarto ensaio teve a mesma metodologia do terceiro, onde se substituiu o extrato de Cupuaçu pelo de Açai e as medidas de g/L foram substituídas por mL, mas a proporção continuou. Todos os procedimentos de assepsia dos recipientes que receberam os meios de cultura seguiram os padrões laboratoriais rigorosamente estabelecidos.

2. 1. 1. Preparação dos biofilmes

Os biofilmes foram mantidos a temperatura de 25° em seu período de formação (25 dias). Depois de formados, foram colocados em placas de vidro como preparação para as análises experimentais de AFM e DRX.

2. 2. Caracterização dos Biofilmes

2. 2. 1. Difração de Raios-X (DRX)

As análises foram realizadas no Laboratório de Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). As amostras de biofilmes variaram de 2 a 4 cm² e foram colocadas em um porta amostra com base de vidro e revestimento lateral de alumínio, para posteriormente serem levadas a câmara. Os difratogramas, que são os espectros de raios-X, foram obtidos em um difratômetro da marca Rigaku, modelo Miniflex II, com modo de operação de radiação Cu K α ($\lambda = 1.542\text{\AA}$, 40 kV e 1,2 mA) que pode analisar tanto amostras sólidas como pulverizadas. A intensidade relativa foi registrada à temperatura ambiente numa faixa angular de (2θ) a uma taxa de 1°/min em um tamanho de passo de 0,02, mesmo equipamento descrito por Lopes e Filho (2014).

2. 2. 2. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A topografia das superfícies dos biofilmes foi analisada usando um Microscópio de Força Atômica (AFM) no Laboratório de Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). As imagens foram obtidas, sob condições ambientes (umidade relativa média de 51%), em um microscópio da marca nanosurf, modelo easyscan 2 controler em modo contato,

com cantilever de silício ContAL-G, com frequência de ressonância de 13 kHz e constante elástica de 0,2 N/m. As amostras, quando obtidas foram colocadas em placas de vidro após serem formadas, para que não fossem causados estresses na amostra, e fixadas no porta amostra com fita dupla face.

As imagens foram obtidas no AFM operando no modo contato em uma região de análise de $30 \mu\text{m}^2$, em uma razão de varredura 0,7 segundos por linha. Foram feitas 20 imagens de cada amostra para obter-se uma média representativa do parâmetro de análise que é a Raiz Quadrática Média da rugosidade R_{RMS} que dá o valor eficaz ou magnitude da rugosidade média R_M , parâmetros esses que foram determinados pelo software WSxM versão 5.0 (Nanotec Eletronica S. L.), cujo calculo se dá segundo as equações (KHULBE et. al., 2008).

$$R_M = \int \int_a |Z(x, y)| \cdot dx \cdot dy \quad (1)$$

onde R_M é rugosidade média avaliada sobre a superfície completa, e $Z(x,y)$ é a função altura do perfil vertical.

$$R_{RMS} = \sqrt{\int \int_a |Z(x, y)|^2 \cdot dx \cdot dy} \quad (2)$$

onde R_{RMS} é Raiz Quadrática Média da rugosidade.

2. 2. 3. Homogeneidade Topográfica

Todas as análises de entropia foram realizadas no Laboratório de Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). Foi usada a técnica de mapeamento de entropia superficial descrita por Figueiredo (2015), que encontrou um novo método para calcular entropia de

superfícies, onde o mesmo argumenta que uma topografia superficial pode ser caracterizada por uma única matriz de alturas w_{ij} , sendo as entradas, as respectivas alturas pontuais (pixels) estacionados em (x_i, y_j) ou somente (i, j) .

Nesta técnica cria-se uma matriz de $N \times N$ pixels e estima-se o primeiro e o terceiro quartis Q_1 e Q_3 , posteriormente estima-se que $\tilde{Q}_1 = Q_1 - 1.5|Q_3 - Q_1|$ e $\tilde{Q}_3 = Q_3 + 1.5|Q_3 - Q_1|$ sejam as extremidades do boxplot. Aqui o universo de pixels de respectivas alturas h_{ij} satisfeita à condição $h_{ij} \in [\tilde{Q}_1, \tilde{Q}_3]$ é denominado de padrão uniforme. Em contraste se tivermos $h_{ij} \notin [\tilde{Q}_1, \tilde{Q}_3]$ denominamos padrão não uniforme.

Para Figueiredo, (2015) a entropia da topografia de uma superfície esta ligada a uniformidade da distribuição de alturas, onde se assume que somente as alturas não são suficientes para a caracterização da distribuição de alturas em toda a área. Assim, se for conhecido que as alturas estão na região $h_{ij} \in [\tilde{Q}_1, \tilde{Q}_3]$ então se podem encontrar os padrões de entropia dessa superfície.

Numa mesma linha de raciocínio, se a cada conjunto de pontos que determina uma seção vertical da superfície com coordenadas x_i fixa e y_j variável, ou vice-versa, for possível associar um valor de probabilidade, então será possível determinar o valor da entropia em analogia ao que argumenta (JONES, 1997) em seu trabalho sobre cartografia de superfícies.

De posse dos argumentos acima, tem-se:

$$w_{ij} \left\{ \begin{array}{l} 1 \quad \text{se } h_{ij} \in [\tilde{Q}_1, \tilde{Q}_3] \\ 0 \quad \text{se } h_{ij} \notin [\tilde{Q}_1, \tilde{Q}_3] \end{array} \right\} \quad (3)$$

Neste caso cada pixel contribui na uniformidade da rugosidade superficial da forma:

$$p_{ij} = \frac{w_{ij}}{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N w_{ij}}, \quad (4)$$

onde p_{ij} é a probabilidade de haver pixels discrepantes ou não no universo de alturas, w_{ij} e a matriz de alturas que representa a superfície e N é o numero total de pixels.

A entropia topográfica é tomada como a entropia de Shannon na mesma linha de pensamento que Nosonovsky, 2010 da forma:

$$H^{(2)} = -\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N p_{ij} \log p_{ij}, \quad (5)$$

que na sua forma normalizada e centralizada fica:

$$H_{matr\ alt} = \frac{H^{(2)} - H^{(2)}_{mim}}{H^{(2)}_{max} - H^{(2)}_{mim}}, \quad (6)$$

onde $H^{(2)}_{max} = \log N^2$ representa a superfície com padrões uniformes mínimos e $H^{(2)}_{mim} = \log N^2/2$ representa a superfície com padrões não uniformes.

Todas as equações que materializam esta técnica foram programadas em linguagem R com o software RStudio (Version 0.99.441, 2009-2015 RStudio, Inc.). Assim um código foi gerado para obter os valores de entropia superficial via matriz de alturas (FIGUEIREDO, 2015).

2.4. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software R (Versão 2.13.2, the R Foundation for Statistical Computing). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) para comparar os valores médios das medidas de R_{RMS} e entropia de todos os

biofilmes, ao nível de um intervalo de confiança e poder de teste 0,05, com execução do teste de Tukey, para verificar a diferença honestamente significativa, quando F foi muito significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Difração de raios-X (XRD)

As análises da difração de raios-X foram realizadas para determinar a influência do Kefir, Cupuaçu e Açaí na estrutura cristalina dos biofilmes, levando em consideração que há formação de filme só com o açúcar mascavo.

Os difratogramas dos biofilmes contendo Kefir com concentrações de 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L e 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L, mantendo a concentração de açúcar mascavo em 40g/L mostraram-se semelhantes as do filme sem kefir, com uma leve redução na intensidade relativa, conforme mostra a fig. 1. Nagendra, 2000 afirma que o alargamento dos picos de intensidade caracteriza a redução na intensidade, assim está evidente que os biofilmes de kefir são menos cristalinos que os filmes sem kefir.

No caso dos biofilmes contendo extrato de Cupuaçu com concentração de Kefir e açúcar mascavo em 40g/L (constantes) e variação da concentração do extrato de Cupuaçu, mostraram-se semelhantes as do filme sem kefir e dos biofilmes com kefir, conforme fig. 2. Nota-se, todavia, que houve um leve aumento na intensidade relativa no pico do difratograma da concentração de 100 g/L em relação aos demais, conforme mostra a fig. 2, o que pode representar, inclusive, alteração na superfície desse biofilme.

Para os biofilmes que continham extrato de Açai com concentração de Kefir e açúcar mascavo em 40g/L (constantes) e variação da concentração de extrato de Açai, a situação foi um pouco diferente, conforme mostra a fig. 3. Nota-se que nos biofilmes com concentrações 10 mL a 20 mL a intensidade dos picos de difração não apresentou mudanças significativas, mas no pico de 40 e 60 mL houve alteração significativa, o que sugere alteração superficial drástica em comparação com os biofilmes de 10 mL a 20 mL.

Em geral os biofilmes possuem picos de difração de baixa intensidade em torno de 19-20° (2θ), que são semelhantes aos resultados encontrados por Ghasemlou *et al.*, 2011 que mediu os XRD para filmes contendo kefirano (isolado a partir de grãos de kefir). A intensidade do pico de difração pouco se alterou para todos os biofilmes quando a concentração foi variando.

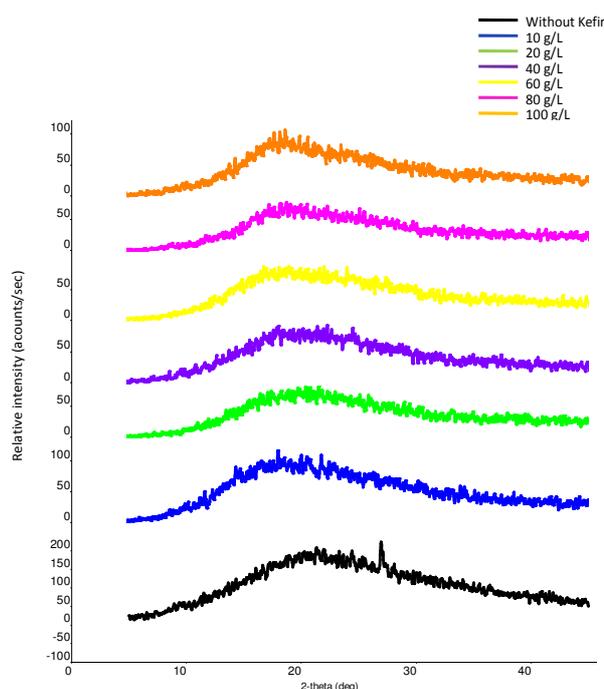


Fig. 1. Comparação dos difratogramas dos biofilmes de kefir com o difratograma do filme sem kefir.

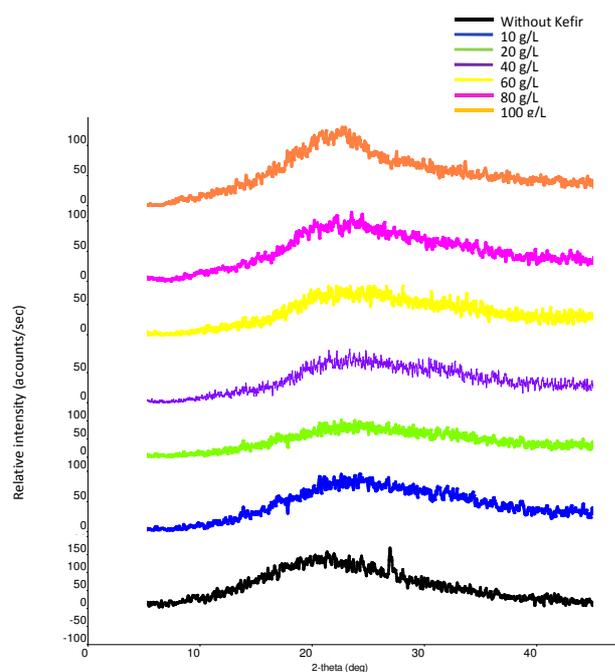


Fig. 2. Comparação dos difratogramas dos biofilmes de kefir com extrato de Cupuaçu com o difratograma do filme sem kefir.

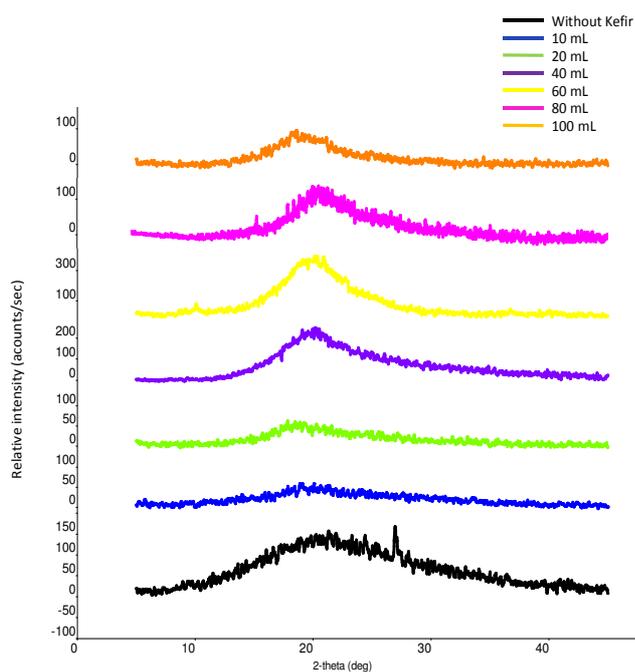


Fig. 3. Comparação dos difratogramas dos biofilmes de kefir com extrato de Açai com o difratograma do filme sem kefir.

Estes resultados mostram que os biofilmes de Kefir, Kefir com extrato de Cupuaçu e Kefir com extrato de Açai são materiais semicristalinos, o que indica que o Açai e o Cupuaçu adicionam boa miscibilidade aos biofilmes, assim como o

kefirano nos filmes contendo glicerol relatado por Ghasemlou *et al.*, 2011, além de outros processos biológicos adicionais como a fermentação do Açaí e do Cupuaçu devidos a presença de microorganismos. Embora haja diferença na composição dos biofilmes os resultados de DXR foram muito semelhantes, em todos os casos, com pouca alteração na atividade cristalina. Esta semelhança pode ser devida ao processo de formação dos biofilmes.

3. 2. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A AFM é uma técnica bastante usada no estudo de superfícies e pode fornecer informações qualitativas e quantitativa sobre biopolímeros em nano escala. Essas informações são em geral pouco acessíveis por outras técnicas experimentais.

É uma ferramenta importante no estudo de superfícies, e tem sido usado para fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre biopolímeros em escala nanométrica que são muitas vezes inacessíveis por qualquer outra técnica experimental.

Recentemente foi usada para estudar filmes comestíveis por Bergo, 2010; Ghanbarzadeh e Oromiehie, 2008 e filmes de kefirano por Ghasemlou *et al.*, 2011). A Fig. 4 mostra imagens 3D e de deflexão do biofilme sem Kefir obtido nesta análise que apresentou rugosidade de 466.26 nm. A Fig. 5 mostra imagens 3D e de deflexão dos biofilmes de Kefir. A Fig. 6 mostra imagens 3D dos biofilmes de Kefir com extrato de Cupuaçu. A Fig. 7 mostra imagens 3D e de deflexão dos biofilmes de Kefir com extrato de Açaí.

O biofilme que apresentou superfície menos rugosa foi o de Kefir com extrato de Cupuaçu

(10g/L) nas concentrações de 40g/L e 40g/L de açúcar mascavo e kefir, respectivamente, mostrando uma rugosidade (RMS) de 320.09 nm. Este valor é muito acima do valor encontrado por Ghasemlou *et al.*, 2011) para películas de kefirano puro que foi de cerca de 119.3 nm. Porém o kefirano naquele caso foi isolado de grãos de kefir e aqui os grãos de kefir foram o inóculo. Para Israelachvili, 2011 a fusão de membranas in vivo não segue um padrão pré-estabelecido daí a formação irregular nos biofilmes com a prevalência de muitos aglomerados, o que pode explicar a discrepância na rugosidade.

A figura 4 revela que não há, preferencialmente, lactobacilos ou leveduras em filmes sem kefir. Já as figuras 5, 6 e 7 revelam a existência dos lactobacilos e leveduras em biofilmes contendo kefir e isso foi possível, pois as imagens de deflexão resultam em vantagens como alta sensibilidade e limite de resolução em nível atômico, pequeno volume das amostras empregado nas análises e baixo tempo de análise (FERREIRA e YAMANAKA, 2006).

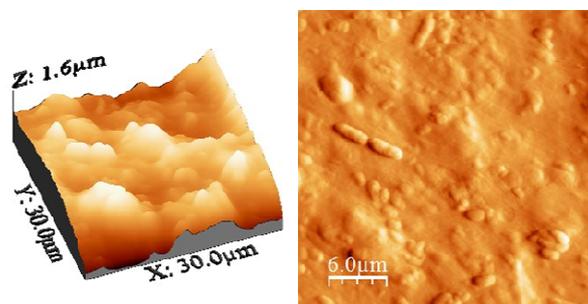


Fig. 4. Imagens topográficas de AFM do biofilme sem Kefir.

Por outro lado o biofilme que se apresentou mais rugoso foi o de Kefir com extrato de Açaí (100g/L), mostrando uma rugosidade (RMS) de 785.905 nm. O mais importante de tudo nestes

resultados e o fato de que biofilmes com rugosidade alta podem ter boa adesividade, assim como verificado por Kantorsk e Pagani, 2007 que mostrou que o biofilme dentário se forma em maior quantidade em superfícies rugosas, por serem rugosos.

A julgar pelas formações de ilhas nos biofilmes de (Kefir, Kefir com extrato de Cupuaçu e kefir com extrato de Açaí) esses biofilmes se assemelham muito com substâncias anfifílicas do mesmo tipo das descritas por (ISRAELACHVILI, 2011) (que se caracteriza por ter um headgroup polar e outro apolar). Nesse tipo de substância a interação de van der Waals é bem frequente, condição necessária para a adesividade, atuando essencialmente na junção pela interação dipolo-dipolo das moléculas polares e pela interação dipolo-dipolo induzido das moléculas apolares, por isso percebe-se as formações de muitas ilhas nos biofilmes.

Do ponto de vista Microbiológico a superfície dos biofilmes mostram, principalmente, os de Kefir com extrato de Cupuaçu e Kefir com extrato de Açaí, a prevalência de lactobacilos em baixas concentrações geralmente entre 10 g/L a 40 g/L e de leveduras para altas concentrações entre 60 g/L a 100 g/L. Esta predominância pode indicar que os biofilmes concentram seus melhores níveis de agentes cicatrizadores (no caso as bactérias) nestas concentrações.

Por outro lado, comparando-se estes resultados aos resultados de DRX apresentados acima se verifica que em biofilmes de kefir com extrato de cupuaçu houve mudança significativa na superfície depois da concentração de 80 g/L.

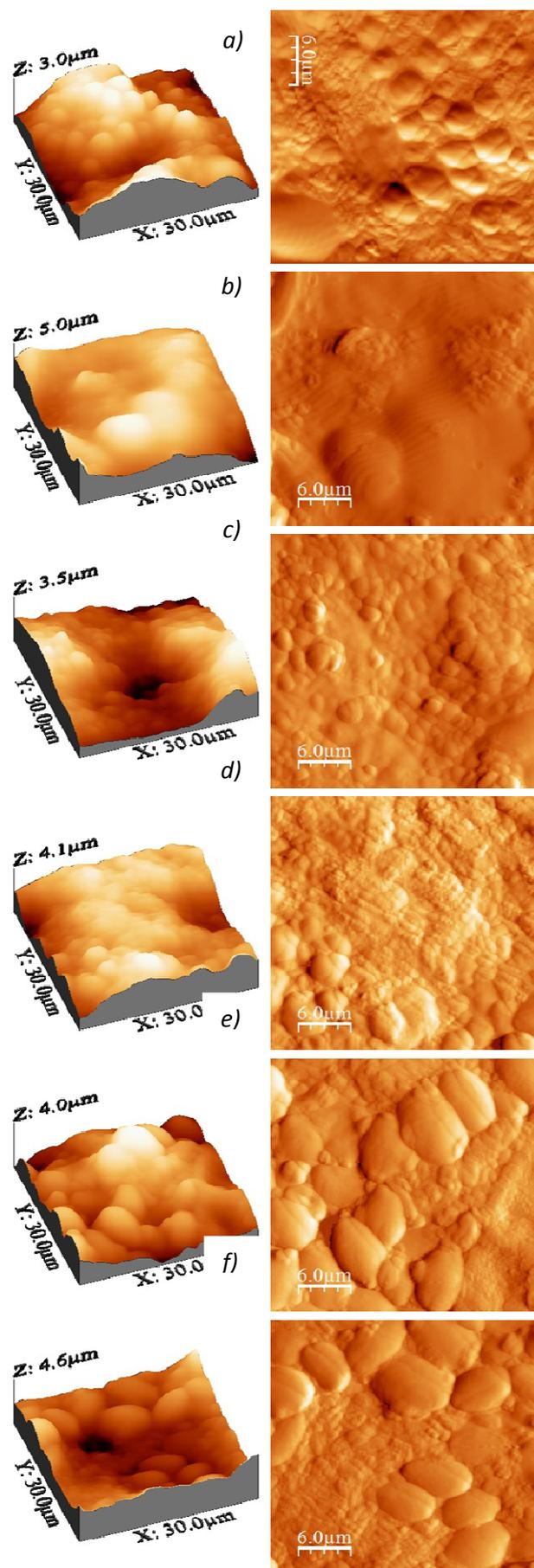


Fig. 5. Imagens topográficas de AFM dos biofilmes de Kefir, onde a) Conc. 10 g/L, b) Conc. 20 g/L c) Conc. 40 g/L, d) Conc. 60 g/L, e) Conc. 80 g/L e f) Conc. 100 g/L.

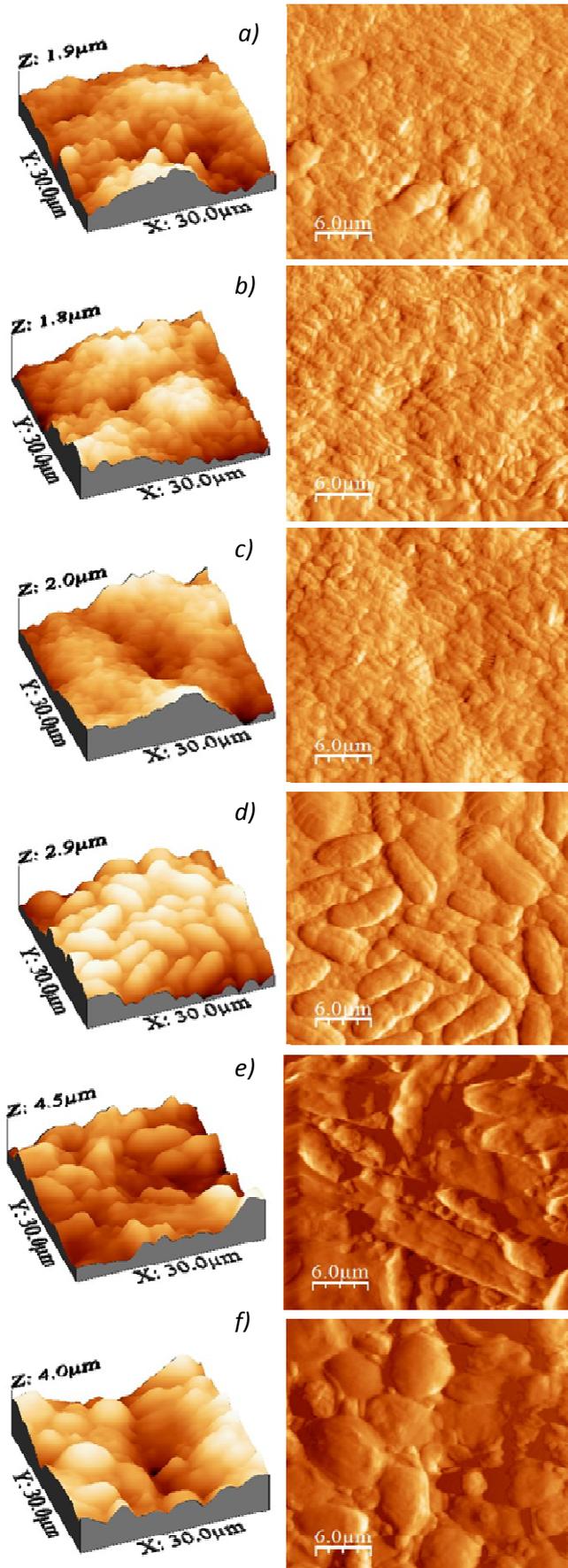


Fig. 6. Imagens topográficas de AFM do biofilme de Kefir com extrato de Cupuaçu, onde a) Conc. 10 g/L, b) Conc. 20 g/L c) Conc. 40 g/L, d) Conc. 60 g/L, e) Conc. 80 g/L e f) Conc. 100 g/L.

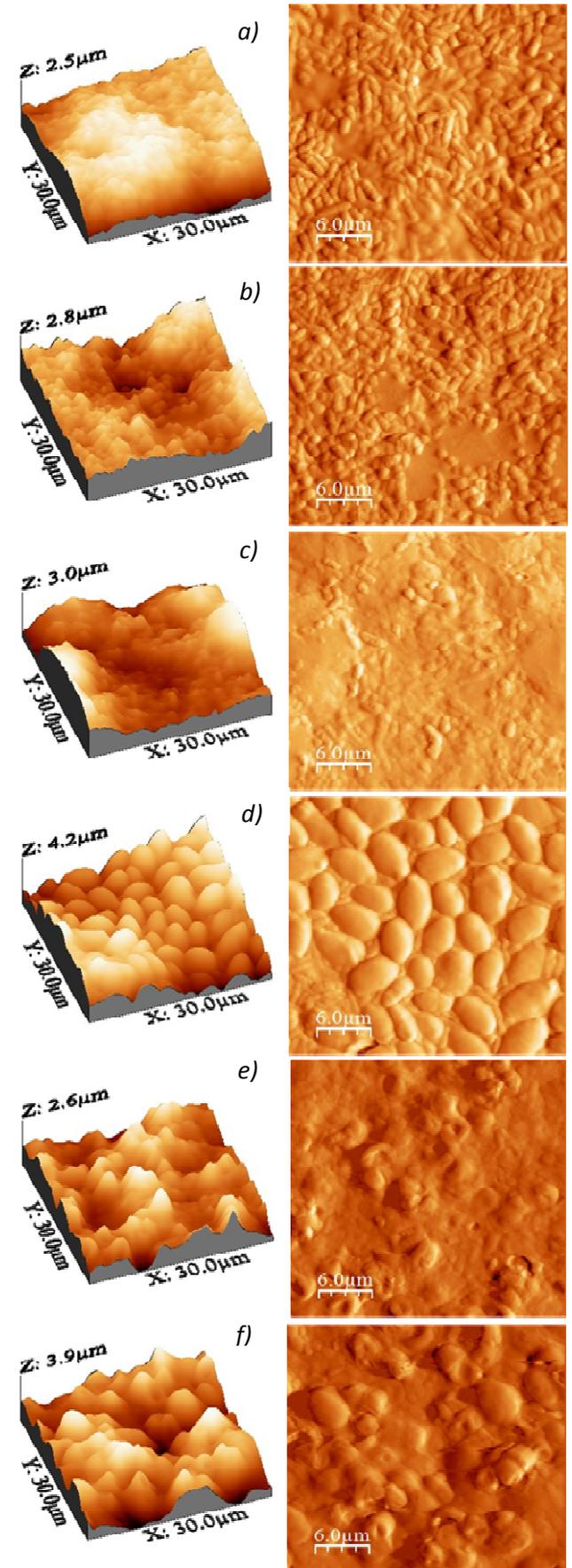


Fig. 7. Imagens topográficas de AFM do biofilme de Kefir com extrato de Açai, onde a) Conc. 10 g/L, b) Conc. 20 g/L c) Conc. 40 g/L, d) Conc. 60 g/L, e) Conc. 80 g/L e f) Conc. 100 g/L.

O mesmo ocorreu com o de Açaí após a concentração de 60 g/L, ratificando-se que quando se aumenta a concentração de extrato de Cupuaçu ou de Açaí nos biofilmes a rugosidade e a cristalinidade aumentam e que a superfície sofre modificação na sua composição superficial.

Este fato reforça que os biofilmes podem ser usados como potenciais curativos naturais tendo em vista a atividade antibactericida do kefir e a antioxidante e restauradora de tecidos do Cupuaçu e do Açaí, cuja ação deste último foi demonstrada por Machado (2010).

Os biofilmes com kefir, Açaí e Cupuaçu apresentaram características superficiais diferentes dos biofilmes sem kefir, pois apresentaram evidências claras de lactobacilos e leveduras em sua superfícies, evidências essas não encontradas nos biofilmes contendo kefir.

O aumento da rugosidade com o aumento da concentração nos biofilmes pode ser devida ao aumento da coalocência (aderência), já que todos os organismos vivos possuem seu próprio sistema emulsificante (ORDÓÑEZ, 2005) capazes de modificar as propriedades da superfícies. Além disso superfícies amfifílicas permitem a adesão de muitas substâncias (ISRAELACHVILI, 2011).

Os resultados correspondentes dos parâmetros de rugosidade são mostrados na Tabela 1. As superfícies dos biofilmes foram se tornando mais rugosas à medida que a concentração aumentou. Para os biofilmes de Kefir com Cupuaçu e Kefir com Açaí, a rugosidade variou muito pouco entre 10 g/L e 40 g/L, mas variou significativamente entre 40 g/L e 60 g/L. Posteriormente, entre 60 g/L e 100 g/L, novamente houve pouco aumento na rugosidade. Estes resultados mostram que entre 60

g/L e 100 g/L tem-se o ponto de saturação do crescimento da rugosidade dos biofilmes e que podem ter os biofilmes com melhor adesividade. Porém, apenas experimentos com concentrações superiores a 100 g/L podem comprovar esta ideia.

Filme sem Kefir		
Conc.	R_M (nm)	R_{RMS} (nm)
40g/L	369.725	466.26
Biofilme de Kefir		
Conc.	R_M	R_{RMS}
10 g/L	526.95	633.28
20 g/L	542.095	671.515
40 g/L	549.985	693.02
60 g/L	553.185	693.205
80 g/L	553.755	694.255
100 g/L	556.33	697.285
Biofilme de Kefir com Cupuaçu		
Conc.	R_M (nm)	R_{RMS} (nm)
10 g/L	254.44	320.09
20 g/L	256.24	323.98
40 g/L	266.045	333.215
60 g/L	454.64	527.27
80 g/L	573.865	723.34
100 g/L	590.585	742.05
Biofilme de Kefir com Açaí		
Conc.	R_M (nm)	R_{RMS} (nm)
10 mL	303.075	379.818
20 mL	352.255	450.745
40 mL	380.87	482.1
60 mL	596.52	750.735
80 mL	575.865	776.49
100 mL	634.375	785.905

Tabela 1. Valores médios (e desvio padrão) dos parâmetros de rugosidade obtida a partir de imagens de microscopia de força atômica; R_M , R_{RMS} (vinte imagens foram analisadas em cada caso).

Por outro lado, a ANOVA mostrou que entre os biofilmes de kefir não há diferença significativa nos valores de rugosidade com $F=0.5371$, $p=0.7502$. Mas, os biofilmes de kefir com extrato de cupuaçu e kefir com extrato açaí houve diferença significativa ($p<0.001$) com $F= 40.1980$ e $F= 16.6067$, principalmente na transição dos grupos de 10 g/L - 40 g/L a 60 g/L - 100 g/L .

Esta diferença pode está relacionada a boa miscibilidade do Cupuaçu, tendo em vista seu caráter fibroso (VRIESMANN *et al*, 2010; SALGADO *et al.*, 2012) e do Açaí, também fibroso, assim como o Glicerol, o Sorbitol e os Ácidos Graxos fizeram nos filmes de kefirano reportados por (GANZELOU *et al*, 2011) embora estes componentes sejam bastante fibrosos. O caráter fibroso do extrato de Açaí e de Cupuaçu resulta em aumento na rugosidade superficial, e que foi observado em concentrações a partir de 60 g/L para ambos os casos, conforme mostra a tabela 1.

Como os biofilmes formados eram consistentes e quando as forças de adesão entre duas membranas são suficientemente fortes, elas serão submetidas a uma transformação completa por fusão em estruturas maiores ou completamente diferentes, conforme argumenta (ISRAELACHVILI, 2011) o isso significa que esses biofilmes possuem força de adesão suficientemente forte ao ponto de se aderir em outras superfícies. Assim, acredita-se que esses biofilmes podem servir como biocurativos aderindo-se a pele.

3.3. Homogeneidade Topográfica

A entropia superficial é um parâmetro que influência a estrutura química e tensão superficial dos materiais (MORAIS, 2008). A não uniformidade superficial pode indicar irregularidades topográficas e problemas na adesividade.

Os resultados correspondentes dos parâmetros de entropia da rugosidade são mostrados na Tabela 2. Todos os biofilmes apresentaram entropia próxima de 1 que é considerada ótima segundo

(FIGUERIREDO, 2015), onde o menor valor encontrado foi de $H=0.971$ com 1276.8 (valor médio) padrões não uniformes para o biofilme de Kefir na concentração de 40 g/L e o maior valor foi de $H=0.991$ com 386 padrões não uniformes para o biofilme de Kefir com extrato de Açaí na concentração de 100 g/L.

Filme sem Kefir			
<i>Conc.</i>	<i>ETA</i>	<i>H</i>	<i>R_{RMS}</i>
40g/L	1089.5	0.976	466.26
Biofilme de Kefir			
<i>Conc.</i>	<i>ETA</i>	<i>H</i>	<i>R_{RMS}</i>
10 g/L	782.45	0.982	633.28
20 g/L	978.55	0.978	671.515
40 g/L	1276.8	0.971	693.02
60 g/L	765.15	0.982	693.205
80 g/L	1159.5	0.974	694.255
100 g/L	1071.5	0.976	697.285
Biofilme de Kefir com			
<i>Conc.</i>	<i>ETA</i>	<i>H</i>	<i>R_{RMS}</i>
10 g/L	812.6	0.982	320.09
20 g/L	1015.4	0.977	323.98
40 g/L	914.9	0.980	333.215
60 g/L	854.8	0.981	527.27
80 g/L	1146.8	0.974	723.34
100 g/L	856.25	0.980	742.05
Biofilme de Kefir com Açaí			
<i>Conc.</i>	<i>ETA</i>	<i>H</i>	<i>R_{RMS}</i>
10 mL	1167.6	0.974	379.818
20 mL	1220.5	0.973	450.745
40 mL	1148.6	0.974	482.1
60 mL	722.6	0.984	750.735
80 mL	960.35	0.978	776.49
100 mL	386	0.991	785.905

Tabela 1. Valores de H, ETA (e desvio padrão) dos parâmetros de rugosidade obtida a partir de imagens de microscopia de força atômica (vinte imagens foram analisadas em cada caso).

Atribui-se essa forte uniformidade superficial novamente a grande coalescência, miscibilidade e demais processos biológicos como a fermentação do Açaí e do Cupuaçu, causada pelos agentes emulsificantes dos organismos vivos

(ISRAELACHVILI, 2011) que compõem o kefir assim como as fibras que compõem o extrato de Açaí e o extrato de Cupuaçu.

Embora haja algum contraste entre os valores de H para cada caso, estatisticamente, verificou-se que não há diferença significativa na uniformidade topográfica. A ANOVA das médias apresentou $F=0.5720$, $p=0.7136$, para os biofilmes de kefir; $F=0.3948$, $p=0.8523$ para os biofilmes de kefir com Cupuaçu e $F=2.0893$, $p=0.0706$ para os biofilmes de kefir com Açaí.

O resultado acima é importante, pois se o biofilme for testado como biocurativo há a possibilidade de não haver a formação de bolhas na superfície do biofilme depois de aderido a outras superfícies, característica essa de superfícies uniformes. Contudo, é fundamental que estudos da adesividade superficial e da interação entre os biofilmes e a pele sejam feitos para a constatação desta ideia.

4. CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizada a caracterização superficial de biofilmes de kefir, kefir com Cupuaçu e Kefir com Açaí, obtidos a partir da inoculação de grãos de kefir em solução de açúcar mascavo. A rugosidade superficial dos biofilmes foi estudada pela comparação das características superficiais. Padrões de difração de raios-X dos biofilmes confirmaram uma estrutura amorfa-cristalina, sem o picos agudos associados com estruturas cristalinas. Imagens de AFM indicaram que a rugosidade da superfície dos biofilmes aumentou conforme a concentração: nos biofilmes de kefir esse aumento não representou, estatisticamente, diferença significativa; nos biofilmes de Kefir com Cupuaçu e

Kefir com Açaí esse aumento representou, estatisticamente, diferença significativa, principalmente na transição de 40 g/L a 60 g/L o que indica que a adesão se comporta da mesma forma haja vista que a literatura mostra que superfícies rugosas tendem a ser adesivas. Foram determinados padrões de uniformidade superficial dos biofilmes, onde todos os biofilmes apresentaram H próximo de 1 o que indica que a adesão também é uniforme. Todos os resultados indicam que os biofilmes possuem alta rugosidade comparado a valores referentes a membranas de kefirano em estudos realizados pela literatura e que podem ser usados como curativos naturais caso sua adesividade acompanhe as características superficiais, resguardados é claro os potenciais terapêuticos das substâncias que fazem parte das suas composições além de estudos da interação biofilme-pele. Os métodos investigados e desenvolvidos neste estudo podem ser importantes em futuras pesquisas em desenvolvimento de fármacos a base de biofilmes.

REFERÊNCIAS

- [1] ALASALVAR, C.; AL-FARSI, M.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F.; WIKTOROWICZ. Effect of chill storage and modified atmosphere packing(MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry*, vol. 89, p. 69-76, 2005.
- [2] BERGO P., SOBRAL P. J. A., PRISON J. M., *J. Food Process. Preserv.* 34 (2010) 401–410.
- [3] BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, P. A.; BOBBIO, P. A.; FADELLI, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 20, n.3, p. 388-390, 2000.
- [4] CARVALHO, N. C. Efeito do método de produção de kefir na vida de prateleira e na

infecção experimental com *Salmonella Typhimurium* em camundongos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil, 2011.

[5] CEVIKBAS, A.; YEMNI, E.; EZZEDENN, F.; YARDIMICI, W. T. Antitumoural, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytother*, vol. 8, 78-82, 1994.

[6] CHMIELEWSKY, R. A. N.; FRANK, J. F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilme on buna-N rubber. *LWT-Food Science and Technology*, v. 29, p. 11-19, 2006.

[7] COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Obtenção e caracterização física, química e físico-química de liquor de cupuaçu e de cacau. *Brazilian journal food technology*, v. 7, n. 1, p. 57-67, 2004.

[8] DOMINGUES, A. F. N.; EMMI, D. T.; BARROSO, R. F. F.; MATTIETTO, R. A. Pigmentos antociânicos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como evidenciadores de biofilme dental. Embrapa Amazônia Oriental, 2012.

[9] DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*, v. 15, p. 155-166, 2002.

[10] FERREIRA, A. A. P. F.; YAMANAKA, H.. Microscopia de força atômica aplicada em imunossaios. *Quím. Nova*. 29 (1) São Paulo, 2006.

[11] FIGUEIREDO, S. S. Análise de superfícies foliares: um estudo sobre a entropia como parâmetro de uniformidade superficial e a superhidrofobicidade da espécie vegetal *Thalia geniculata* (LINEU, 1753). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amapá, Amapá, Brasil, 2015.

[12] FILHO, V. C YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *QUÍMICA NOVA*, Vol. 21 No. 1, 1998.

[13] FILHO, H. D. F., LOPES C. G. A.. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. *Macapá*, v. 3, n. 2, p. 41-50, 2013.

[14] FURUKAWA, N.; MATSUOKA, A.; TAKAHASHI, T.; YAMANAKA, Y. Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival day in mice bearing Meth-A. *Anim. Sci. Tec.*, v. 62, p. 579-585, 1991.

[15] GHANBARZADEH, B., OROMIEHI, A. R., *Int. J. Biol. Macromol.* 43 (2008) 209–215.

[16] GHASEMLOU, M.; KHODAIYAN, F.; OROMIEHIE, A. Rheological and structural characterization of film-forming solutions and biodegradable edible film made from Kefiran as affected by various plasticizer types. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 49, p. 814– 821\$, 2011.

[17] HERRMANN, P. S. P.; SILVA, M. A. P.; BERNARDES, R. F, JOB, A. E.; COLNAGO, L. A., FROMMER, J. E. E MATTOSO, LUIZ H.C. *Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros. Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 1997.

[18] HOMMA, A. K. O.; FRAZÃO, D. A. C. O despertar da fruticultura amazônica. *Fruticultura em Revista*, p. 27-31, 2002.

[19] IADEROZA, M.; BALDINI, I. S. D.; BOVI, M. L. A. Anthocyanins from Fruits of Açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.). *Tropical Science*, vol. 32, p. 41-46, 1992.

[20] ISRAELACHVILI J. N., *Intermolecular and Surface Forces*, 3rd, Elsevier, Academic Press, 2011.

[21] JONES, C. B. *Geographical Information Systems and Computer Cartography*. 1. ed. Essex: Addison-WesleyLongman Limited, 1997.

[22] JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química. Nova*, Vol. 29, No. 2, p. 326-337, 2006.

[23] KANTORSK, K. Z; PAGANI, C.. Influência da rugosidade superficial dos materiais odontológicos na adesão bacteriana: revisão de literatura. *Revista brasileira de odontologia da universidade Cidade de São Paulo*. 19 (3) 325-330, 2007.

[24] KHULBE, K.C.; FENG C.; MATSUURA T. *Synthetic Polymeric Membranes: Characterization by Atomic Force Microscopy*, 1st ed., Springer, 2008.

[25] KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; FILHO, J. M.; FETT, R. Aplicacion de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidant en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

[26] KUSKOSKI, E. M.; FETT, P.; ASUERO, A. G. Antocianos: un grupo de pigmentos naturales. Aislamiento, identificación y propiedades. *Alimentaria*, vol. 2, n. 61, p. 61-74, 2002.

[27] LANNES, S. C. S. Cupuassu: a new confectionery fat from Amazonia. *INFORM-AOCS*, vol. 14, p. 40–41, 2003.

- [28] LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities, *Iberoam Micol*, v. 23, Spain, 2006.
- [29] MACHADO, A. C. H. R. Desenvolvimento e avaliação da incorporação e liberação de óleo de açaí em hidrogéis de poli (N-vinil-2-pirrolidona). Dissertação de mestrado em ciências na área da tecnologia nuclear-materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, 2010.
- [30] MAEDA, H.; ZHU, X.; OMURA, K.; SUZUKI, S.; KITAMURA, S. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors*, vol. 22, p. 197–200, 2004.
- [31] MAGALHÃES, T. M. Caracterização microbiológica e química da bebida quefir de leite e açúcar mascavo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2008.
- [32] MARSHALL, K. C.; STOUT R.; MITCHEL R. Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *Journal of General Microbiology*, vol. 68, p. 337-348, 1971.
- [33] MENEZES, E. M. S. Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açaí pré-congelada (*Euterpe Oleracea*, Mart.). Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 83pp, 2005.
- [34] MENEZES, E. M. S.; TORRES A. T.; SRUR A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amazonia*, vol. 38, n.2 p. 311–316, 2008.
- [35] MORAIS, D.. Avaliação da Tensão Superficial do PVB e da PA-6. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Materiais Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2008.
- [36] N. NAGENDRA; U. RAMAMURTY, T. T. GOH; Y. LI. Effect Of Crystallinity On The Impact Toughness Of A La-Based Bulk Metallic Glass. *Acta mater*, n. 48, pags. 2603±2615, 2000.
- [37] NAVARRO, Z. Desenvolvimento rural no Brasil: os limites do passado e os caminhos do futuro. *Estudos Avançados*, n.43, v.15, 2001.
- [38] NOSONOVSKY, M. Entropy in Tribology: in the Search for Applications, *Entropy*, Vol. 12, 2010.
- [39] ORDÓÑEZ, J. A. Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos, vol. 1 São Paulo: editora Artmed, 2005.
- [40] OZELA, E. F.; STRINGHETA, P. C.; LIMA, A. A. S.; FARIAS, M. I. T.; SANTOS, M. V. Estudo comparativo do teor de antocianinas presentes no açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), nos períodos de safra e entresafra. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, vol. 2, Campinas, UNICAMP, 1997.
- [41] PAN, Y.; BREIDT, J.; KATHARIOU, S. Resitence of *Listeria monocytogenes* biofilmes to sanitizing agents in simulated food processing environment. *Applied and enviromental microbiology*, v. 72, p. 7711-7717, 2006.
- [42] PORTINHO, J. AL.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos Benéficos do Açaí. *International Journal of Nutrology*, v.5, n.1, p. 15-20, jan./abr. 2012.
- [43] RIGANO, L. A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SEDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P.S.; QUESTA, J.; DOWN, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A.; MARANO, M. R. Biofilm formation epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* PV. Citri. *Molecular plant-microbe interations*, v. 20, p. 1222-1230, 2007.
- [44] ROGEZ, H. Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação. Ed. Universidade Federal do Pará – EDUPA, Belém, Pará. 360pp, 2000.
- [45] SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; COSTA, J. M. C.; FONSECA, A. V. V. Atividade antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online, 2010.
- [46] SEMIH, O.; CAGINDI, O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.
- [47] SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.95-100, 2005.
- [48] SOUTO, R. N. M. Uso da radiação γ , combinada à refrigeração, na conservação de polpa de açaí (*Euterpe Oleracea*, Mart.). Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 95pp, 2001.
- [49] TRESSE, O.; SHANNON, K.; PINON, A.; MALLE, P.; VIALETTE, M.; MIDELET-BOURDIN, G. Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food processing facilities and clinical cases to inert surfaces.

Journal of food protection, v. 70, p. 1569-1578, 2007.

[50] YAGUISHITA, N. Cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa (MembracelR) em dorso de ratos. Dissertação de Mestrado, 2006.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Neste estudo foi realizada a caracterização superficial de biofilmes de kefir, kefir com Extrato de Cupuaçu e Kefir com extrato de Açaí, obtidos a partir da inoculação de grãos de kefir em solução de açúcar mascavo.
- A rugosidade superficial dos biofilmes foi estudada pela comparação das características superficiais.
- Padrões de difração de raios-X dos biofilmes confirmaram uma estrutura amorfa-cristalina, sem o picos agudos associados com estruturas cristalinas.
- Imagens de AFM indicaram que a rugosidade da superfície dos biofilmes aumentou conforme a concentração: nos biofilmes de kefir esse aumento não representou, estatisticamente, diferença significativa; nos biofilmes de Kefir com extrato de Cupuaçu e Kefir com extrato de Açaí esse aumento representou, estatisticamente, diferença significativa, principalmente na transição de 40 g/L a 60 g/L o que indica que a adesão se comporta da mesma forma haja vista que a literatura mostra que superfícies rugosas indicam adesividade.
- Foram determinados padrões de uniformidade superficial dos biofilmes, onde todos os biofilmes apresentaram H próximo de 1 o que indica que a adesão também é uniforme.
- Todos os resultados indicam que os biofilmes possuem alta rugosidade comparado a valores referentes a membranas de kefirano em estudos realizados pela literatura e que podem ser usados como curativos naturais caso sua adesividade acompanhe as características superficiais, resguardados é claro os potenciais terapêuticos das substâncias que fazem parte das suas composições, além de estudos da interação biofilme-pele.
- Os métodos investigados e desenvolvidos neste estudo podem ser importantes em futuras pesquisas em desenvolvimento de fármacos a base de biofilmes.

REFERÊNCIAS

- ALBERS, A. P. F., MELCHIADES, F. G., MACHADO, R., BALDO, J. B., BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. *Cerâmica*, 48, (305), 2002.
- ALASALVAR, C.; AL-FARSI, M.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F.; WIKTOROWICZ. Effect of chill storage and modified atmosphere packing(MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry*, vol. 89, p. 69-76, 2005.
- ALVES, R., ARTERO, A., SEBBENN, A.. Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., by microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 26 (3), 373-379, 2013.
- AMOS, M. R., SANCHEZ-CONTRERAS, M., JACKSON, R. W., MUNOZ-BERBEL, X., CICHE, T. A., YANG, G., COOPER, R. M., WATERFIELD, N. R.. Influence of the *Photobacterium luminescens* Phosphomannose Isomerase Gene, *manA*, on Mannose Utilization, Exopolysaccharide Structure, and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (3), 776, 2011.
- AMSELLEM-LAUFER, M. *Euterpe oleracea* Martius (Arecaceae) : Açaí. *Phytothérapie*, 13 (2), 135-140, 2015.
- ATHANASIADIS, I., BOSKOU, D., KANELLAKI, M., KOUTINAS, A., ATHANASIADIS, I.. Effect of Carbohydrate Substrate on Fermentation by Kefir Yeast Supported on Delignified Cellulosic Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2), 658-663, 2001.
- ATIEH A., ZAHRA T., SOUDEH G., SOMAYYEH G., ELAHE M.. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus* strains: emphasis on their effects on cancer cells. *International Immunopharmacology* 28, (1), 88–96, 2015.
- BAKKEN, J. S.. Staggered and Tapered Antibiotic Withdrawal With Administration of Kefir for Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis*. 59 (6): 858-861, 2014.
- BARBOSA, A. F., LOPES, F. J., SILVA, V. R. O., SILVA, M. H. L., MINIM, V. P. R., SILVA, R. C. S. N.. Aceitação sensorial de iogurte sabor pêssego acrescido de diferentes concentrações de aroma e polpa por meio da técnica de mapa de preferência. *Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”*, 68 (390), 52-58, 2013.
- BERGMANN, R. S. O., PEREIRA M. A., VEIGA, S. M. O. M., SCHNEEDORF, J. M., OLIVEIRA, N. M. S., FIORINI, J. E.. Microbial profile of a kefir sample preparations - grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Ciênc. Tecnol. Aliment*; 30 (4), 2010.
- BERGO P., SOBRAL P. J. A., PRISON J. M., *J. Food Process. Preserv.* 34 (2010) 401–410.
- BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, P. A.; BOBBIO, P. A.; FADELLI, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 20, n.3, p. 388-390, 2000.

- BOVENKAMP, G. L., ZANZEN, U., KRISHNA, K. S., HORMES, J., PRANGE, A.. X-Ray Absorption Near-Edge Structure (XANES) Spectroscopy Study of the Interaction of Silver Ions with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (20), 6385-6390, 2013.
- CABAL, A., GÓMEZ-BARRERO, S., PORRERO, C., BÁRCENA, C., LÓPEZ, G., CANTÓN, R., GORTÁZAR, C., DOMÍNGUEZ, L., ÁLVAREZ, J.. Dechlorination of Chloral Hydrate Is Influenced by the Biofilm Adhesion Protein LapA in *Pseudomonas putida* LF54. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 79(13), p.4166, 2013.
- CARASI, P., DÍAZ, M., S. RACEDO, M., ANTONI, G., URDACI, M. C., SERRADELL, M A. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. *BioMed Research International*, 2014 (1), 1-7, 2014.
- CARVALHO, C. A. C., ÁLVARES, V. S., CUNHA, C. R., LIMA, A. A., MORENO, A. L., MACIEL V. T.. Efeito do pré-resfriamento de frutos de cupuaçu na aceitação sensorial do néctar = Effect of cupuassu fruits pre-cooling on the sensory acceptance of the néctar. *Agro@ambiente On-line*, 9 (1), 91-95, 2015.
- CARVALHO, L., LIMA, M. D., MAXIMO, A. D., PEREIRA, E. D., MOREIRA, W. D., FERREIRA, A. G., VERAS, S. D., SOUZA, M. G.. Study of root and leaf rachis of *spathelia excelsa*: phytochemistry and activity against fungus *moniliophthora perniciosa* associated with cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). *Quimica Nova*, 35 (11), 2237-2240, 2012.
- CARVALHO, N. C. Efeito do método de produção de kefir na vida de prateleira e na infecção experimental com *Salmonella Typhimurium* em camundongos. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais, Brasil, 2011.
- CEBALLOS, G.; VILLARREAL, F. The beneficial vascular effects of cacao flavanols: having your cake and eating it too *J. Appl. Physiol.* 111, 1544– 1549, 2011.
- CEVIKBAS, A.; YEMNI, E.; EZZEDENN, F.; YARDIMICI, W. T. Antitumoural, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytother*, vol. 8, 78-82, 1994.
- CHEN, H. L., TUNG, Y. T., CHUANG, C. H., TU, M. Y., TSAI, T. C., CHANG, S. Y., CHEN, C. M.. Kefir improves bone mass and microarchitecture in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis International*, 26 (2), 589-599, 2015.
- CHEN, H-L., TUNG, Y-T., TSAI, C-L., LAI, C-W., LAI, Z-L., TSAI, H-C., LIN, Y-L., WANG, C-H., CHEN, C-M. Kefir improves fatty liver syndrome by inhibiting the lipogenesis pathway in leptin-deficient ob/ob knockout mice. *International Journal of Obesity*, 2013.
- CHEN, Y., CHEN, M.. Effects of *Lactobacillus kefirifaciens* M1 Isolated from Kefir Grains on Germ-Free Mice. *PLoS One*, 8 (11), 2013.
- CHMIELEWSKY, R. A. N.; FRANK, J. F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilme on buna-N rubber. *LWT-Food Science and Technology*, v. 29, p. 11-19, 2006.
- COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Obtenção e caracterização física, química e físico-química de liquor de cupuaçu e de cacau. *Brazilian journal food technology*, v. 7, n. 1, p. 57-67, 2004.

- DOMINGUES, A. F. N.; EMMI, D. T.; BARROSO, R. F. F.; MATTIETTO, R. A. Pigmentos antociânicos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como evidenciadores de biofilme dental. *Embrapa Amazônia Oriental*, 2012.
- DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biolms lately? *Clinical microbioly reviews*, v. 15, p. 155-166, 2002.
- DUCKER, W. A., SENDEN, T. J., PASHLEY, R. M.. Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope. *Nature*, 353, 239–241, 1991.
- EL-SAYED, M, A.. A New Algorithm Based Entropic Threshold for Edge Detection in Images. *IJCSI International Journal of Computer Science*. 8 (5), 1694-0814, 2011.
- ERTEKIN, B GUZEL-SEYDIM, Z. B Effect of fat replacers on kefir quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (4), 543-548, 2010.
- FERREIRA, A. A. P. F; YAMANAKA, H.. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. *Quím. Nova*. 29 (1) São Paulo, 2006.
- FIGUEIREDO, S. S. Análise de superfícies foliares: um estudo sobre a entropia como parâmetro de uniformidade superficial e a superhidrofobicidade da espécie vegetal *Thalia geniculata* (LINEU, 1753). Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal do Amapá*, Amapá, Brasil, 2015.
- FILHO, H. D. F., LOPES, G. A. C.. Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de Difractometria de Raios-X. *Macapá*, 3, (1), 31-45, 2013.
- FILHO, V. C YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, Vol. 21 No. 1, 1998.
- FRIQUES, A., KLIPPEL, B., LEAL, M., KALIL, I., ANDRADE, T., PEREIRA, T., MEYRELLES, S., VASQUEZ, E.. The Probiotic Kefir Improves Cardiovascular Function in Spontaneously Hypertensive Rats. *Faseb Journal*, 29 (1), 2015.
- FURUKAWA, N.; MATSUOKA, A.; TAKAHASHI, T.; YAMANAKA, Y. Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival day in mice bearing Meth-A. *Anim. Sci. Tec.*, v. 62, p. 579-585, 1991.
- GAO, J., GU, F., ABDELLA, N. H., RUAN, H., HE, G.. Investigation on Culturable Microflora in Tibetan Kefir Grains from Different Areas of China. *Journal of Food Science*, 77 (8), M425-M433, 2012.
- GHASEMLOU, M.; KHODAIYAN, F.; OROMIEHIE, A. Rheological and structural characterization of film-forming solutions and biodegradable edible film made from Kefiran as affected by various plasticizer types. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 49, p. 814– 821, 2011.
- GOLFINOPOULOS, A., SOUPIONI, M., KOPSAHELIS, N., TSAOUSHI, K., KOUTINAS, A. A.. Lactose uptake rate measurements by ¹⁴C-labelled lactose reveals promotional activity of porous cellulose in whey fermentation by kefir yeast. *Food Chemistry*, 134 (4), 1973-1981, 2012.

- GÓRSKA-FRĄCZEK, S., SANDSTROM, C., KENNE, L., RYBKA, J., STRUS, M., HECZKO P, GAMIAN A. Structural studies of the exopolysaccharide consisting of a nonasaccharide repeating unit isolated from *Lactobacillus rhamnosus* KL37B. *Carbohydr Res.* 346, 2926–2932, 2011.
- GULITZ, A., STADIE, J., WENNING, M., EHRMANN, M. A., VOGEL, R. F.. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 151 (3), 2011.
- HEINRICH, M., DHANJI, T., CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) - A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. *Phytochemistry Letters*, 4 (1), 10–21, 2011.
- HERRMANN, P. S. P.; SILVA, M. A. P.; BERNARDES, R. F, JOB, A. E.; COLNAGO, L. A., FROMMER, J. E. E MATTOSO, LUIZ H.C. Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 1997.
- HO, J., CHOI, J., LIM, W., KIM, M., LEE, I., CHO, H.. Kefir inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of adipogenic transcription factor expression. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (3), 485-490, 2013.
- HOLDERNESS, J., SCHEPETKIN, I., FREEDMAN, B., KIRPOTINA, L., QUINN, M., HEDGES, J., JUTILA, M.. Polysaccharides Isolated from Açai Fruit Induce Innate. *Immune Responses PLoS One*, 6 (2), 2011.
- HOMMA, A. K. O.; FRAZÃO, D. A. C. O despertar da fruticultura amazônica. *Fruticultura em Revista*, p. 27-31, 2002.
- HONG, W., CHEN, Y., CHEN, M.. The Antiallergic Effect of Kefir Lactobacilli. *Journal of Food Science*, 75 (8), H244-H253, 2010.
- HORIGUCHI, T., ISHIGURO, N., CHIHARA, K., OGI, K., NAKASHIMA, K., SADA, K., HORI-TAMURA, N.. Inhibitory effect of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp on IgE-mediated mast cell activation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (10), 5595-5601, 2011.
- IADEROZA, M.; BALDINI, I. S. D.; BOVI, M. L. A. Anthocyanins from Fruits of Açai (*Euterpe oleracea*, Mart.). *Tropical Science*, vol. 32, p. 41-46, 1992.
- ISRAELACHVILI J. N., Intermolecular and Surface Forces, 3rd, *Elsevier, Academic Press*, 2011.
- JIE GAO., FENGYING GU., ABDELLA, N. H., HUI R., GUOQING H. E.. Investigation on culturable microflora in Tibetan Kefir grains from different areas of China. *Journal of Food Science*, 77 (7-9), M425-M433, 2012.
- JONES, C. B. Geographical Information Systems and Computer Cartography. 1. ed. Essex: *Addison-Wesley Longman Limited*, 1997.
- JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quimica Nova*, Vol. 29, No. 2, p. 326-337, 2006.
- KAJIKAWA, A., IGIMI S.. Development of Recombinant Vaccines in Lactobacilli for Elimination of Salmonella. *Bioscience Microflora*, 30 (4), 93–98, 2011.

- KANG, J., XIE, C., LI, Z., NAGARAJAN, S., SCHAUSS, A. G., WU, T., WU, X.. Flavonoids from Açai (Euterpe oleracea Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities *Food Chemistry*, 128 (1), 152-157, 2011.
- KANTORSK, K. Z; PAGANI, C.. Influência da rugosidade superficial dos materiais odontológicos na adesão bacteriana: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*. 19 (3) 325-330, 2007.
- KAY, M., ERWIN, T., MCLEAN, R., ARON, G. K.. Bacteriophage Ecology in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa Mixed-Biofilm Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (3), 21-829, 2011.
- KESMEN, Z., KACMAZ, N.. Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *Journal of Food Science*, 76 (5), M276-M283, 2011.
- KHULBE, K.C.; FENG C.; MATSUURA T. Synthetic Polymeric Membranes: Characterization by Atomic Force Microscopy, 1st ed., *Springer*, 2008.
- KIM, J., KWON, J., KIM, S., HAN, S., WON, Y., LEE, J. KIM, C., FUKATSU, T., LEE, B. K. J.. Purine Biosynthesis, Biofilm Formation, and Persistence of an Insect-Microbe Gut Symbiosis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 80, 4374-4382, 2014.
- KIM, T., KANG, J., LEE, J.H., YOON, J.. Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy. *Water Research*, 45, (15),4615–4622, 2011.
- KORHONEN, J. M., VAN HOEK, A. H. A. M., SAARELA, M., HUYS, G., TOSI, L., MAYRHOFER, S., VON WRIGHT, A.. Antimicrobial susceptibility of Lactobacillus rhamnosus. *Beneficial Microbes*, 1, (1), 75–80, 2010.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; FILHO, J. M.; FETT, R. Aplicacion de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidant en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.4, p.726-732, 2005.
- KUSKOSKI, E. M.; FETT, P.; ASUERO, A. G. Antocianos: un grupo de pigmentos naturales. Aislamiento, identificación y propiedades. *Alimentaria*, vol. 2, n. 61, p. 61-74, 2002.
- LANNES, S. C. S. Cupuassu: a new confectionery fat from Amazonia. *INFORM-AOCS*, vol. 14, p. 40–41, 2003.
- LAUREYS, D., VUYST, L .. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (8), 2564-2572, 2014.
- LEITE, A. M. O., MIGUEL, M. A. L., PEIXOTO, R. S. , ROSADO , A. S., SILVA, J. T., PASCHOALIN, V. M. F.. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz J Microbiol.*; 44 (2): 341–349, 2013.
- LI, J., CHEN, J. B.. Probability density evolution method for dynamic response analysis of structures with uncertain parameters. *Computational Mechanics*. 34, (5), 400-409, 2004.

- LIAO, H., SHELOR, C. P., CHEN, Y., SABAA-SRUR, A. U. O., SMITH, R. E., DASGUPTA, P. K.. Anion composition of açai extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (25), 5928-35, 2013.
- LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; Kefir: a simbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Iberoam Micol*, v. 23, Spain, 2006.
- LU, M., WANG, X., SUN, G., QIN, B., XIAO, J., YAN, S., PAN, Y., WANG, Y.. Fine Structure of Tibetan Kefir Grains and Their Yeast Distribution, Diversity, and Shift (Tibetan Kefir Grains). *Cecile*, 9 (6), 101-387, 2014.
- MACHADO, A. C. H. R. Desenvolvimento e avaliação da incorporação e liberação de óleo de açai em hidrogeis de poli (N-vinil-2-pirrolidona). Dissertação de mestrado em ciências na área da tecnologia nuclear-materiais, *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares*, São Paulo, SP, 2010.
- MAEDA, H.; ZHU, X.; OMURA, K.; SUZUKI, S.; KITAMURA, S. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors*, vol. 22, p. 197–200, 2004.
- MAGALHÃES, K. T., DRAGONE, G., PEREIRA, G. V., OLIVEIRA, J. M., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J. A., SILVA, J. B. A., SCHWAN, R. F.. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chemistry*, 126 (1), 249-253, 2011.
- MAGALHÃES, T. M. Caracterização microbiológica e química da bebida quefir de leite e açúcar mascavo. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Lavras*, Minas Gerais, Brasil, 2008.
- MANTZOURANI, I., PLESSAS, S., SAXAMI, G., ALEXOPOULOS, A., GALANIS, A., BEZIRTZOGLU, E.. Study of kefir grains application in sourdough bread regarding rope spoilage caused by *Bacillus* spp. *Food Chemistry*, 143, 17-21, 2014.
- MARSHALL, K. C.; STOUT R.; MITCHEL. R. Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *Journal of General Microbiology*, vol. 68, p. 337-348, 1971.
- MARTIN, Y., WILLIAMS, C. C., WICKRAMASINGHE, H. K.. Atomic force microscope–force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *Journal of Applied Physics*, 61, (10), 4723, 1987.
- MASTROPAOLO, M. D., SILBY, M. W., NICOLL, J. S. LEVY, S. B.. Novel Genes Involved in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 Motility and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (12), 4318, 2012.
- MAYRHOFER, S., VAN, H. A. H., MAIR, C., HUYS, G., ARTS, H. J., KNEIFEL, W., DOMIG, K. J..m Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (1), 81–87, 2010.
- MENEZES, E. M. S. Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açai pré-congelada (*Euterpe Oleracea*, Mart.). Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, Seropédica, RJ. 83pp, 2005.

- MENEZES, E. M. S.; TORRES A. T.; SRUR A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (Euterpe oleracea Mart) liofilizada. *Acta Amazonia*, vol. 38, n.2 p. 311–316, 2008.
- MOORMEIER, D. E., ENDRES, J. L., MANN, E. E., SADYKOV, M. R., HORSWILL, A. R., RICE, K. C., FEY, P. D. BAYLES, K. W.. Use of Microfluidic Technology To Analyze Gene Expression during Staphylococcus aureus Biofilm Formation Reveals Distinct Physiological Niches. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (11), 3413, 2013.
- MORADI, M., SONG, Z. , NIE, X., YAN, M., HU, F. Q. Investigation of bacterial attachment and biofilm formation of two different Pseudoalteromonas species: Comparison of different methods. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 65, (1), 70–78, 2016.
- MORAIS, D.. Avaliação da Tensão Superficial do PVB e da PA-6. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Materiais. *Universidade de São Paulo*, São Paulo, SP. 2008.
- MORGAN, K. S., PAGANIN, D. M., SIU, K. W.. X-ray phase imaging with a paper analyzer. *Applied Physics Letters*, 100 (12), 2012.
- MOTA, D. A., FRAGATA, N. P., BRITO, É. P., CASAGRANDE, D. R. ROSA, B. L., BORGES, C. R. A.. Cupuassu cake in feeding feedlot Nellore young bulls. *Boletim de Indústria Animal*, 71 (4), 09-316, 2014.
- N. NAGENDRA; U. RAMAMURTY, T. T. GOH; Y. LI. Effect Of Crystallinity On The Impact Toughness Of A La-Based Bulk Metallic Glass. *Acta mater*, n. 48, pags. 2603±2615, 2000.
- NAVARRO, Z. Desenvolvimento rural no Brasil: os limites do passado e os caminhos do futuro. *Estudos Avançados*, n.43, v.15, 2001.
- NIELSEN, B., GÜRAKAN, G., ÜNLÜ, G.. Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6 (3), 123-135, 2014.
- NIKOLIC, M., LÓPEZ, P., STRAHINIC, I., SUÁREZ, A., KOJIC, M., FERNÁNDEZ-GARCÍA, M., TOPISIROVIC, L., GOLIC, N., RUAS-MADIEDO, P.. Characterisation of the exopolysaccharides (EPS)-producing Lactobacillus paraplantarum BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int J Food Microbiol.* 158, 155–162, 2012.
- NOSONOVSKY, M. Entropy in Tribology: in the Search for Applications, *Entropy*, Vol. 12, 2010.
- OLIVEIRA, T. B., GENOVESE, M. I.. Chemical composition of cupuassu (Theobroma grandiflorum) and cocoa (Theobroma cacao) liquors and their effects on streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Research International*, 51 (2), 929-935, 2013.
- ORDÓÑEZ, J. A. Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos, vol. 1 São Paulo: editora Artmed, 2005.
- OSTADRAHIMI, A., TAGHIZADEH, A., MOBASSERI, M., FARRIN, N., PAYAHOO, L., GHESHLAGHI, Z. B., VAHEDJABBARI, M.. Effect of Probiotic Fermented Milk (Kefir) on Glycemic Control and Lipid Profile In Type 2 Diabetic Patients: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Iran J Public Health*, 44 (2), 228–237, 2015.

- OZELA, E. F.; STRINGHETA, P. C.; LIMA, A. A. S.; FARIAS, M. I. T.; SANTOS, M. V. Estudo comparativo do teor de antocianinas presentes no açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), nos períodos de safra e entresafra. *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, vol. 2, Campinas, UNICAMP, 1997.
- PAN, Y.; BREIDT, J.; KATHARIOU, S. Resitence of listeria monocytogenes biofilmes to sanitizing agents in simulated food processing environment. *Applied and enviromental microbiology*, v. 72, p. 7711-7717, 2006.
- PINTO, E. P., RAMOS, G. Q., FILHO, H. D. F.. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. *Estação Científica Macapá*, v. 3, n. 2, p. 41-50, 2013.
- PLESSAS, S., ALEXOPOULOS, A., BEKATOROU, A., BEZIRTZOGLU, E. Kefir Immobilized on Corn Grains as Biocatalyst for Lactic Acid Fermentation and Sourdough Bread Making. *Journal of Food Science*, 77 (12), C1256-C1262, 2012.
- POLAK-BERECKA, M., WAŚKO, A. , PADUCH, R., SKRZYPEK, TOMASZ., SROKA-BARTNICKA, A.. The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 751–762, 2014.
- PORTINHO, J. AL.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos Benéficos do Açaí. *International Journal of Nutrology*, v.5, n.1, p. 15-20, jan./abr. 2012.
- PUGLIESE, A. G., TOMAS-BARBERAN, F A., TRUCHADO, P., GENOVESE, M. I. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (11), 2720-2728, 2013.
- RADMILOVIC, V., GASTEIGER, H.A., ROSS, P. N.. Structure and Chemical Composition of a Supported Pt-Ru Electrocatalyst for Methanol Oxidation. *Journal of Catalysis*, 154 (1), 98–106, 1995.
- RANER, G., KANGATLA, S., OBERLIES, N., GRAF, T.. Study of antioxidant activity of Acai extracts (*Euterpe oleracea*). *Planta Medica*, 81 (11), 884-885, 2015.
- REUTER, M., MALLETT, A., PEARSON, B. M., ARNOUD H. M.. Biofilm Formation by *Campylobacter jejuni* Is Increased under Aerobic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, 76 (7), 2122, 2010.
- RIGANO, L. A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SEDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P.S.; QUESTA, J.; DOWN, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A.; MARANO, M. R. Biofilm formation epiphytic fitness, and canker development in *xanthomonas axonopodis* PV. Citri. *Molecular plant-microbe interations*, v. 20, p. 1222-1230, 2007.
- ROGEZ, H. Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação. Ed. *Universidade Federal do Pará – EDUPA*, Belém, Pará. 360pp, 2000.
- ROMANIN, D., SERRADELL, M., GONZÁLEZ M. D., LAUSADA, N., GARROTE, G. L., RUMBO, M.. Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140 (2), 102-108, 2010.

- SALGADO, H., LOURENÇO, L., SOUSA, C., ARAÚJO, E.. Dessert made from cupuassu fruit on eastern Amazon: preparation and shelf life. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37 (5), 391–398, 2012.
- SALGADO, J. M., RODRIGUES, B. S., PESTANA, C. M. D., DIA, C. T. S., MORZELLE, M. C.. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) Peel as Potential Source of Dietary Fiber and Phytochemicals in Whole-Bread Preparations. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66 (4), 384-390. 2011.
- SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W., COSTA, J. M. C.; FONSECA, A. V. V. Atividade antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu. *Ciência Rural, Santa Maria*, Online, 2010.
- SEBASTIÃO, F. A. , PILARSKI, F., LEMOS, M. V. F.. Composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by *Flavobacterium columnare* isolated from tropical fish in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 3, 861-864, 2013.
- SEMIH, O.; CAGINDI, O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.
- SETTIN, T., BOTTER, G., ITURBE, R., RINALDO, A.. Numerical studies on soil moisture distributions in heterogeneous catchments. *Water Resources Research*, 43, (5), 2007.
- SHARMA, V. K., BRADLEY L. B.. Hha Controls *Escherichia coli* O157:H7 Biofilm Formation by Differential Regulation of Global Transcriptional Regulators FlhDC and CsgD . *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (7), 2384, 2013.
- SIMOES, M. SIMOES, L. C., VIEIRA, M. J.. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology*, 43, 573–583, 2010.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41 (1), 95-100, 2005.
- SOLHEIM H. T., SEKSE C. , URDAHL, A. M., WASTESON, Y., NESSE, L. L.. Biofilm as an Environment for Dissemination of stx Genes by Transduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (3), 896, 2013.
- SOUTO, R. N. M. Uso da radiação Gamma, combinada à refrigeração, na conservação de polpa de açaí (*Euterpe Oleracea*, Mart.). Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, Seropédica, RJ. 95pp, 2001.
- STOEKER, L., NORDONE, S., GUNDERSON, S., ZHANG, LIN., KAJIKAWA, A., LAVOY, A., MILLER, M., KLAENHAMMER, T. R., DEAN, G. A.. Assessment of *Lactobacillus gasserii* as a Candidate Oral Vaccine Vector. *Clin Vaccine Immunol*, 18 (11), 1834–1844, 2011.
- TOLIOPOULOS, I., SIMOS, Y., VERGINADIS, I, PAPANDREOU, D., OIKONOMIDIS, S., EVANGELOU, A.. Anticancer activities of kefir against LMS and K562 cell lines by flow cytometry analysis", *Nutrition & Food Science*; 42 (4), 261 – 270, 2012.
- TOMISLAV, P., SANJA, S., ŠIMUN, Z., DUBRAVKA, S.. Microbiota of kefir grain. *Mljekarstvo*, 63 (1), 3-14, 2013.

- TRESSE, O.; SHANNON, K.; PINON, A.; MALLE, P.; VIALETTE, M.; MIDELET-BOURDIN, G. Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food processing facilities and clinical cases to inert surfaces. *Journal of food protection*, 70, 1569-1578, 2007.
- UDANI, J. K., SINGH, B. B, SINGH, V. J., BARRETT, ML.. Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutr Journal*, 10 (45), 2011.
- UNDERHILL, D. M. ., ILIEV, I. D.. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol*. 14 (6), 405–416, 2014.
- VARDJAN, T., MOHAR L. P., ROGELJ, I., ČANŽEK M. A.. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 96 (5), 2729-2736, 2013.
- VERNA, E. C., LUCAK, S.. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therap Adv Gastroenterol*. 3 (5), 307–319, 2010.
- VRIESMANN, L. C. ; SILVEIRA, J. L. M. ; PETKOWICZ, C. L. O.. Rheological behavior of a pectin fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). *Carbohydrate Polymers*, 79 (2), 312-317, 2010.
- WANG, S.Y., CHEN, H.C., DAI, T.Y., HUANG I. N., LIU, J.R., CHEN, M.J.. Identification of lactic acid bacteria in Taiwanese ropy fermented milk and evaluation of their microbial ecology in bovine and caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 94, 623–635, 2011.
- WANG, S.Y., CHEN, H.C., DAI, T.Y., HUANG I. N., LIU, J.R., CHEN, M.J.. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiology*, 32 2, 274–285, 2012.
- WANG, W., LI, XC., TANG, W., RUMALLA, SC., AVULA, B., SMILLIE, T., Khan, I.. New Phytochemicals from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Planta Medica*, 77 (05), 2011.
- WENDLING, L. K., WESCHENFELDER, S.. Probióticos e alimentos lácteos fermentados - uma revisão. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, 68 (395), 49-57, 2013.
- YAGUISHITA, N. Cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa (MembracelR) em dorso de ratos. Dissertação de Mestrado, *Faculdade Evangélica do Paraná*, 2006.
- YAMAGUCHI, K. K, L., PEREIRA, L. F. R., LAMARÃO, C. V., LIMA, E. S., VEIGA, V. F.. Amazon Açai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chemistry*, 179, 137-151, 2015.
- ZHENG, Y., LU, Y., WANG, J., YANG, L., PAN, C., HUANG, Y.. Probiotic Properties of Lactobacillus Strains Isolated from Tibetan Kefir Grains. *PLoS One*, 8 (7), 2013.
- ZHUOYING, W., CHENGSONG, Y., FENG G., SHENGHUA Z., XIN Y.. Evidence for Broad-Spectrum Biofilm Inhibition by the Bacterium Bacillus sp. Strain SW9. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (5), 1735, 2013.
- ZHUOYING, W., CHENGSONG, Y., FENG G., SHENGHUA Z., XIN Y.. Biofilm Roughness Determines *Cryptosporidium parvum* Retention in Environmental Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (12), 2012.