



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SYBELLE MONTENEGRO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE EXOPOLISSACARÍDEOS
(EPS) PRODUZIDOS A PARTIR DE *Enterococcus* sp. ISOLADO DE QUEIJO
COALHO ARTESANAL**

RECIFE, 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE EXOPOLISSACARÍDEOS
(EPS) PRODUZIDOS A PARTIR DE *Enterococcus* sp. ISOLADO DE QUEIJO
COALHO ARTESANAL**

SYBELLE MONTENEGRO DOS SANTOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

RECIFE, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237a Santos, Sybelle Montenegro dos
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS) PRODUZIDOS
A PARTIR DE Enterococcus sp. ISOLADO DE QUEIJO COALHO ARTESANAL / Sybelle Montenegro dos
Santos. - 2022.
26 f. : il.

Orientadora: Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares.
Inclui referências e anexo(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

1. atividades biológicas. 2. bactérias ácido láticas . 3. ensaios in vitro. I. Soares, Maria Taciana
Cavalcanti Vieira, orient. II. Título

CDD 574

SYBELLE MONTENEGRO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE EXOPOLISSACARÍDEOS
(EPS) PRODUZIDOS A PARTIR DE *Enterococcus* sp. ISOLADO DE QUEIJO
COALHO ARTESANAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Recife, 26 de maio de 2022

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (UFRPE)
Orientadora

Dra. Juanize Matias da Silva Batista (UFRPE)
Membro interno

Me. Leandro Paes de Brito (UFPE)
Membro externo

Ma. Elaine Cristina da Silva (UFRPE)
Suplente

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais e professores da vida, Cristina e Sidiclei, que sempre acreditaram na educação, e a minha irmã Keylla por todo apoio.

Agradeço à minha orientadora/professora Taciana que me acolheu para fazer parte do grupo Bioteclácteos/Labtecbio e que compartilhou comigo seus ensinamentos.

A Juanize que foi a primeira pessoa a me receber ao Labtecbio em meio a pandemia e contribuiu para que esse momento acontecesse.

A todos os meus professores que me ensinaram e fizeram parte dessa jornada, em especial a Paula, Mauro e Martín que moram no meu coração.

A Elaine que esteve comigo todos os dias no laboratório, me ensinando com toda paciência do mundo cada detalhe, e a Leandro que também partilhou de seus conhecimentos, dividindo bons momentos e boas risadas.

A todos os meus amigos e à turma SB3 que fizeram dessa caminhada a mais leve e divertida possível.

A João que sempre está ao meu lado e acompanhou de perto todo esse processo e a minha amiga Kelle que desde a infância está comigo em todos os momentos.

E a todos que de alguma maneira fizeram parte disso.

“Seja menos curioso sobre as pessoas e
mais curioso sobre as ideias.”
(Marie Curie)

RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPS) são macromoléculas produzidas por distintos microrganismos, incluindo as bactérias ácido lácticas (BAL), como linhagens probióticas de *Enterococcus*. Esses possuem além de propriedades bioativas, como antioxidantes, que neutralizam o estresse oxidativo no hospedeiro e reduz a utilização de produtos artificiais nocivos à saúde, comprovada eficácia terapêutica e alta disponibilidade, sendo também indicado a diversas aplicações biotecnológicas. Nesse cenário, as tendências do consumo de alimentos saudáveis abrem novas perspectivas para a aplicação de biopolímeros como o EPS produzido por BAL como aditivos e ingredientes funcionais. Diante disso, objetivou-se a produção, extração e avaliação das atividades antioxidantes de EPS produzidos por *Enterococcus* sp. isolado a partir de queijo coalho artesanal do Estado de Pernambuco, através da eliminação dos radicais: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), hidroxila, 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) e superóxido, por meio de ensaios realizados em laboratório, utilizando o EPS nas seguintes concentrações: 0,2 0,5 1 1,5 e 2 mg/mL. Os resultados obtidos foram aplicados em equações matemáticas, de acordo com cada método utilizado, e comparados com o ácido ascórbico como controle positivo. Além disso, foi utilizado a média e desvio padrão para o teste ANOVA com significância de $p < 0,05$. Dentre os resultados encontrados é notável as atividades antioxidantes desenvolvidas pelo EPS 133v através da capacidade em eliminar os radicais livres. O radical DPPH, atingiu o mínimo de 16% (0,2 mg/mL) e na fração máxima (2 mg/mL) 27% de capacidade de eliminação, o ABTS e o superóxido apresentaram o mínimo de 56% e 42% e a máxima de 72% e 47%, respectivamente, entretanto o radical hidroxila apresentou capacidade de eliminação unicamente na concentração máxima (2 mg/mL). Diante disso, é perceptível que o EPS 133v de *Enterococcus* sp. tem alto potencial de exploração para o desenvolvimento de ingredientes alimentares funcionais ou aditivos com benefícios econômicos e para a saúde.

Palavras-chave: atividades biológicas, bactérias ácido lácticas, ensaios *in vitro*.

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are macromolecules produced by different microorganisms, including lactic acid bacteria (LAB), as probiotic strains of *Enterococcus*. These have, in addition to bioactive properties, such as antioxidants, which neutralize oxidative stress in the host and reduce the use of artificial products harmful to health, proven therapeutic efficacy and high availability, are also indicated for several biotechnological applications. In this scenario, trends in healthy food consumption open new perspectives for the application of biopolymers such as EPS produced by BAL as additives and functional ingredients. Therefore, the objective was to produce, extract and evaluate the antioxidant activities of EPS produced by *Enterococcus* sp. isolated from artisanal coalho cheese from the State of Pernambuco, by scavenging the radicals: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl, 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic (ABTS) and superoxide, through tests carried out in the laboratory, using EPS at the following concentrations: 0.2 0.5 1 1.5 and 2 mg/mL. The results obtained were applied in mathematical equations, according to each method used, and compared with ascorbic acid as a positive control. In addition, the mean and standard deviation were used for the ANOVA test with a significance of $p < 0.05$. Among the results found, it is remarkable the antioxidant activities developed by EPS 133v through its ability to eliminate free radicals. The DPPH radical reached a minimum of 16% (0.2 mg/mL) and in the maximum fraction (2 mg/mL) 27% of scavenging capacity, ABTS and superoxide presented a minimum of 56% and 42% and the maximum of 72% and 47%, respectively, however, the hydroxyl radical showed scavenging capacity only at the maximum concentration (2 mg/mL). Therefore, it is noticeable that the EPS 133v of *Enterococcus* sp. has high exploration potential for the development of functional food ingredients or additives with economic and health benefits.

Key-words: biological activities, lactic acid bacteria, *in vitro* assay.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS	11
2.1 GERAL	11
2.2 ESPECÍFICOS	11
REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1 GÊNERO <i>Enterococcus</i> spp.	11
3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS E APLICAÇÕES	12
3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXOPOLISSACARÍDEOS	14
METODOLOGIA	14
4.1 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DO EPS	14
4.2.1 Capacidade de eliminação do radical DPPH	15
4.2.2 Capacidade de eliminação do radical hidroxila	16
4.2.3 Capacidade de eliminação do radical ABTS	16
4.2.4 Capacidade de eliminação do radical superóxido	16
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL DPPH	17
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL HIDROXILA	18
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL ABTS	19
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL SUPERÓXIDO	19
CONCLUSÃO	21

1. INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos com várias composições e propriedades químicas produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL), além de outros microrganismos. Onde, suas características estruturais influenciam diretamente em suas diversas funções (DI et al., 2018). Esses EPSs, por sua vez, podem contribuir beneficamente à saúde do hospedeiro através das suas propriedades prebióticas. Além disso, possuem excelente capacidade antioxidante, suprindo a perda de elétrons dos radicais livres ou estruturas celulares afetadas por eles durante o processo de oxidação. As propriedades antioxidantes *in vitro* dos EPSs microbianos são investigadas através da determinação da atividade sequestradora de diferentes radicais, entre eles o DPPH, ABTS, hidroxila e dos radicais superóxido, frente a resolutividade aos estresses oxidativos (WANG et al., 2017; MIN et al., 2019; XU et al., 2019).

As propriedades tecnológicas desejáveis dos EPS são atribuídas a diversos fatores como: cepa, estrutura molecular, tipo de ligação e grupos funcionais, além da concentração desses biopolímeros, quando aplicados nos setores alimentícios, exibindo ampla expansão de mercado, trazendo benefícios econômicos e à saúde. O uso de BAL produtoras de EPS na fabricação de produtos lácteos têm apresentado excelentes resultados para a melhoria das características reológicas desses alimentos, além de serem utilizados na produção de queijos e iogurtes (LYNCH et al., 2018). Em consequência disso, crescentes análises abriram novas perspectivas sobre inúmeras funções tecnológicas de moléculas/metabólitos derivados de bactérias, como o EPS produzido por linhagens probióticas do gênero *Enterococcus*.

Na preocupação com a segurança alimentar, a preferência por antioxidantes derivados de recursos naturais pode minimizar os efeitos nocivos, incluindo outras aplicações benéficas. De modo que, o isolamento de novos microrganismos e subsequente avaliação do potencial de produção de EPS é uma ferramenta importante para a obtenção de novas macromoléculas com propriedades químicas e tecnológicas.

Por sua vez, as tendências do consumo de alimentos saudáveis abrem novas perspectivas para a aplicação de biopolímeros como o EPS produzido por BAL como aditivos e ingredientes funcionais.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar as atividades antioxidantes dos exopolissacarídeos (EPS) produzidos por *Enterococcus* sp. isolados a partir de queijo coalho artesanal, de um laticínio localizado no Estado de Pernambuco, Brasil.

2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir e extrair exopolissacarídeos (EPS) a partir de linhagem de *Enterococcus* sp. isolado de queijo de coalho artesanal, utilizando soro de queijo;
- Avaliar a atividade antioxidant do EPS utilizando os radicais: DPPH, hidroxila, ABTS e superóxido;
- Determinar a significância estatística entre os dados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 GÊNERO *Enterococcus* spp.

Enterococcus são bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas que apresentam formato de cocos ovais. São encontradas principalmente no trato gastrointestinal de humanos e outros animais, sendo amplamente distribuídos na natureza. A ocorrência de *Enterococcus* spp. nos alimentos se deve principalmente à sua resistência a condições adversas durante a produção e armazenamento e de sua alta adaptabilidade ao meio (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2017). Apresentam capacidade de crescimento na presença de NaCl em concentrações de 5 a 10% e pH entre 4,6 a 9,9, ainda, são capazes de sobreviver em temperaturas de até 63,5°C por 30 minutos, constituindo a microbiota residual dos alimentos (DOMIG et al., 2003; BERGHE et al., 2006).

Esse gênero (*Enterococcus*) pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL), extremamente importantes na indústria alimentícia, principalmente em produtos lácteos fermentados e outros derivados do leite. Durante a produção de queijo, os fatores de pasteurização do leite desempenham um papel fundamental na seleção microbiana, onde aproximadamente mais de 50% dos *Enterococcus* spp.

sobrevivem à pasteurização de curta duração em alta temperatura (72°C/15s), e outras populações suportam temperaturas de processamento ainda mais altas (85°C/16s) (ZIARNO, 2006). Bactérias do gênero *Enterococcus* são comumente encontradas em queijos cottage e coagulados com coalho feitos de leite cru e pasteurizado (GIRAFFA et al., 1997)

Há um grande interesse biotecnológico por esse grupo de microrganismos, devido a produção de biopolímeros, bacteriocinas e ao aumento na absorção intestinal de nutrientes, além de outras características probióticas. Embora, possam atuar como patógenos oportunistas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as espécies mais reportadas, ainda, existem linhagens dessas mesmas espécies, mas probióticas, sendo comprovadas diferenças genéticas entre elas. Além disso, infecções enterocócicas derivadas de alimentos ainda são pouco relatadas, ainda que, a detecção de fatores de virulência possa auxiliar nesses diagnósticos (REDONDO, 2008; CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2016; GUZMAN et al., 2019; LEE et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

Por sua vez, metabólitos microbianos de *Enterococcus*, como os exopolissacarídeos, que podem ser produzidos por diferentes BALs, são muito utilizados para diversas funcionalidades como: saúde, agricultura e nutrição, devido a sua eficácia terapêutica e alta disponibilidade (SINGH et al., 2017).

3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS E APLICAÇÕES

Os exopolissacarídeos (EPS) são macromoléculas extracelulares de alto peso molecular que podem ser produzidas por bactérias, fungos e/ou algas verde-azuladas. Esses polissacarídeos são compostos por muitos monossacarídeos ligados entre si através de ligações glicosídicas (PEREIRAA et al., 2019). O papel fisiológico que o EPS desempenha nos microrganismos está relacionado à proteção das células bacterianas contra condições extremas, como estresses bióticos e abióticos, além de estar envolvido na adesão superficial e formação de biofilme (DONOT et al., 2012). Dessa maneira, os EPSs podem ser classificados em dois grupos distintos: homopolissacarídeos (HoPSs), composto por unidades repetidas de um mesmo tipo de monossacarídeo e heteropolissacarídeos (HePSs), composto

de duas a oito subunidades repetidas de monossacarídeos diferentes, com base em sua composição química e mecanismos biossintéticos (SAADAT et al., 2019).

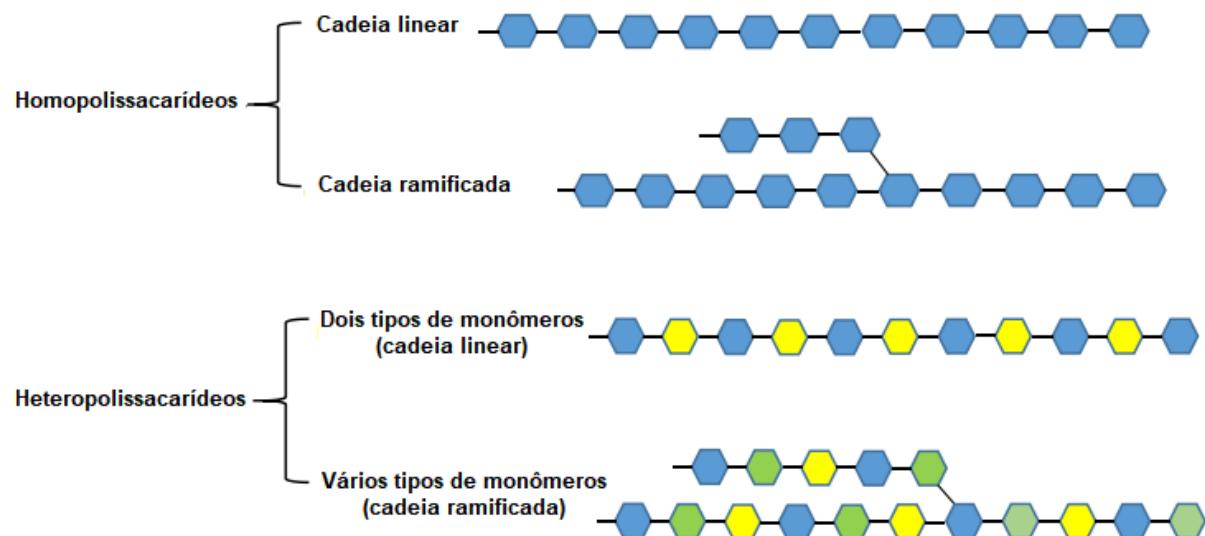


Figura 01. Representação esquemática dos tipos de homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos (traduzido e adaptado de DABA et al., 2021).

É geralmente reconhecido que as suas diversas características estruturais e moleculares implicam diretamente nas suas múltiplas funções (DI et al., 2018). Há um número crescente de estudos sobre a produção de EPS extracelular com propriedades promotoras da saúde, fisiológicos e atividades biológicas, como: antioxidante, antibacteriana, antitumoral, imunorreguladora, hipoglicemiante, anti-hipertensiva e redutora de colesterol, além de promover a colonização de probióticos no trato gastrointestinal do hospedeiro (KIM et al., 2010; ARENA et al., 2014, PORTER & MARTENS, 2017, XU et al., 2019; PV et al., 2019). Esses EPSs que possuem propriedades biológicas são considerados importantes polímeros naturais com diversas aplicações biotecnológicas e industriais (MOHAMED et al., 2018; AYYASH et al., 2020).

Na indústria alimentícia, esses polímeros atuam como agentes espessantes, emulsificantes e estabilizadores naturais, o que elevam sua importância nesse setor (AYYASH et al., 2020). Além disso, as BALs produtoras de EPS podem melhorar as características reológicas e sensoriais de produtos lácteos fermentados, como queijos e iogurtes (GALLE et al., 2011; LYNCH et al., 2018).

Há evidências significativas de que EPSs de BAL apresentam potencial para influenciar a saúde do hospedeiro, podendo modular a função imunológica e atuar nos níveis de probióticos no trato gastrointestinal. Em geral, os heteropolissacarídeos podem ser considerados efetores da imunidade do hospedeiro, enquanto os homopolissacarídeos estão mais associados à modulação da microbiota intestinal, com efeitos prebióticos (LYNCH et al., 2018).

Além de que, alguns fatores como: peso molecular, configuração da ligação glicosídica, conformação da cadeia, grupos funcionais, grau de substituição, bem como os métodos de extração e isolamento adotados são fundamentais na determinação de seus efeitos na saúde do hospedeiro, bem como nas atividades antioxidantes desenvolvidas e outras atividades biológicas, o que explica sua abrangente capacidade funcional (WANG et al., 2015; BHAT & BAJAJ, 2018).

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXOPOLISSACARÍDEOS

Os microrganismos são fontes importantes de vários metabólitos e propriedades medicinais essenciais. Sua adaptabilidade e sobrevivência são realizados por vários desses metabólitos, como os exopolissacarídeos (DEMAIN, 2014). As BALs, são caracterizadas como Generally Recognized as Safe (GRAS – Geralmente Reconhecido como Seguro) e possuem diversas aplicações industriais e sanitárias e podem produzir EPS com propriedades bioativas, como antioxidantes, a fim de agregar valor ao alimento e reduzir o uso de produtos artificiais e aditivos (MORADI et al., 2021).

Fatores como o tempo de estocagem e concentração de metabólitos podem contribuir com o aumento da capacidade antioxidant, desempenhando algumas aplicabilidades como: agentes protetores, agentes terapêuticos, alimentos funcionais e aditivos na preservação de produtos nutricionais (NASCIMENTO., 2017; ANDREW et al., 2020).

De acordo com Wang, et al., 2017, vários estudos foram realizados sobre as atividades antioxidantes *in vitro* de EPS microbiano, pois eles mostraram-se essenciais na resolução de vários estresses oxidativos. Evidências comprovadas destacam que a produção excessiva de radicais livres acelera o envelhecimento do corpo e podem causar doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (LIGUORI et al., 2018). Isso ocorre quando esses átomos reativos interagem com um ou mais

elétrons desemparelhados em sua camada externa e são formados pela metabolização do oxigênio pelo organismo (CHANDRASEKARAN et al., 2017). Assim, agentes antioxidantes protegem os sistemas biológicos da toxicidade dos radicais livres e são extremamente importantes para manter a saúde do consumidor.

Dessa maneira, a literatura disponível, relata que o EPSs de BAL pode ser um promissor substituto de antioxidantes sintéticos para evitar os efeitos colaterais graves que podem ser produzidos por estes agentes químicos (TANG et al., 2017).

4. METODOLOGIA

4.1 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DO EPS

O EPS 133v da linhagem *Enterococcus* sp. foi cultivado em Erlenmeyer, contendo 500 mL de soro de queijo desproteinizado crescido em 24h na temperatura de 30°C. O soro de queijo utilizado no presente estudo foi obtido de um laticínio localizado no Estado de Pernambuco, Brasil. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi coletado.

O açúcar total foi determinado pelo método do ácido fenol sulfúrico, que resume-se à desidratação dos açúcares em meio ácido concentrado e posterior formação de complexo dos mesmos com fenol. O sistema de reação compreende 1 mL de amostra e 1 mL de fenol ao qual se adiciona 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Como a reação é exotérmica, é resfriada a temperatura ambiente antes de fazer a leitura da absorbância a 490 nm (DUBOIS et al., 1956).

Para remover a proteína produzida durante o processo de fermentação, descrito acima, 0,1 M de NaCl foi adicionado ao sobrenadante e mantido a 4°C durante a noite centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante contendo EPS foi tratado pela adição de 70% de etanol por 24h a 4°C. Ainda, foi centrifugado novamente nas mesmas condições descritas acima e o volume coletado foi dissolvido em água milli-Q (Millipore, Xangai, China) e lyophilizado para obtenção do EPS bruto.

4.2 TESTES DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

4.2.1 Capacidade de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A capacidade do EPS para eliminar o radical livre DPPH foi realizada de acordo com SHIMADA et al., 1992. As amostras de EPS (0,2 - 2 mg/mL) a 0,5 mL foram misturadas com 0,5 mL da solução de DPPH 0,1 mM (em etanol a 95%) e reagiram no escuro por 30 min a temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 517 nm. O branco foi preparado substituindo o EPS por metanol e o controle foi utilizado o DPPH e etanol. O ácido ascórbico foi usado como controle positivo em todos os ensaios antioxidantes. A capacidade do EPS de reduzir o DPPH foi quantificada pelo uso da equação dada:

$$DPPH (\%) = \left(\frac{1 - OD \text{ da amostra}}{OD \text{ do controle}} \right) \times 100$$

4.2.2 Capacidade de eliminação do radical hidroxila

A capacidade do EPS em eliminar o radical hidroxila foi medida com a reação Fenton (ZHANG et al., 2013). A mistura de reação contendo 0,25 mL de verde brilhante (0,435 mM), 0,50 mL de sulfato ferroso FeSO₄ (0,5 mM), 0,375 mL de peróxido de hidrogênio H₂O₂ (3,0%, p/v) e 0,25 mL de EPS (0,2 - 2 mg/mL) foi incubada em temperatura ambiente por 20 min, e a absorbância foi medida a 624 nm. A atividade de eliminação de radicais hidroxila é expresso diante da fórmula abaixo, onde: As é a absorbância na presença da amostra, A₀ é a absorbância do controle sem a amostra, e A é a absorbância sem a amostra e o sistema da reação Fenton.

$$OH (\%) = \left(\frac{As - A_0}{A - A_0} \right) \times 100$$

4.2.3 Capacidade de eliminação do radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS)

O ensaio para avaliar a capacidade do EPS em eliminar o radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) foi realizado pelo método descrito por WEI et al., 2018, com algumas modificações. A solução ABTS (7 mM) foi misturada com persulfato de potássio (2,45 mM), reagindo no escuro à

temperatura ambiente por 16 h para produzir o radical livre ABTS. Posteriormente, a solução ABTS foi diluída com etanol (95%) até uma absorbância de 734 nm. Em seguida, amostras contendo 0,2 mL de EPS (0,2 - 2 mg/mL) foram adicionadas a 1 mL de solução ABTS e mantidas no escuro à temperatura ambiente por 20 min. A leitura foi executada em espectrofotômetro a 734 nm. A atividade de eliminação do radical ABTS foi conduzida utilizando a fórmula:

$$ABTS (\%) = \left(\frac{1 - OD \text{ da amostra}}{OD \text{ do controle}} \right) \times 100$$

4.2.4 Capacidade de eliminação do radical superóxido

A avaliação da capacidade do EPS em eliminar o radical O²⁻ foi determinada de acordo com o método de WANG et al., 2017 com pequenas modificações. Em resumo, 0,25 mL de EPS (0,2 - 2 mg/mL) foi misturado com 1 mL de solução tampão Tris-HCl (50 mM/pH 8,2), mantido a 25°C por 20 min. Em seguida, 0,1 mL de solução de pirogalol (30 mM) foi adicionado e a mistura foi mantida a 25°C por 5 min. Por fim, 0,5 mL de HCl foi adicionado ao sistema para terminar a reação. O espectrofotômetro foi calibrado com solução tampão Tris-HCl, e a absorbância foi detectada em 325 nm. A atividade de eliminação do radical O²⁻ foi calculada através da fórmula abaixo, onde, A0 é a absorbância da reação de Tris-HCl com pirogalol, A1 é a absorbância da solução EPS mais o O²⁻, e A2 é a absorbância da solução tampão Tris-HCl e solução de amostra EPS.

$$O_2^- (\%) = \left[\frac{1 - (A1 - A2)}{A0} \right] \times 100$$

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão e a análise estatística foi realizada pelo método ANOVA, $p < 0,05$ foi reconhecido como significativo. Os gráficos foram elaborados com o software GraphPad Prism 9.3.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL DPPH

O DPPH é uma ferramenta amplamente aceita para estimar as atividades de eliminação de radicais livres por antioxidantes, por ser um radical livre e estável. Quando os radicais DPPH são capturados, a cor da mistura da reação muda de roxo para amarelo. De acordo com a figura 02 (A), a capacidade antioxidant do EPS aumenta conforme o aumento da concentração, exibindo uma tendência de atividade proporcional às concentrações utilizadas. O EPS utilizado na concentração mínima (0,2 mg/mL) apresentou 16% de atividade antioxidant e a máxima (2 mg/mL) com 27%. O controle positivo (ácido ascórbico) exibiu atividade antioxidant acima de 85% nas mesmas concentrações (0,2 - 2 mg/mL).

JIA et al., 2019 reportou que a fração EPS purificada (A23-2 e A23-4) obtida de *E. faecium* (WEFA23) exibiu atividade de eliminação de DPPH inferior a 20% na concentração de 2 mg/mL. No entanto, em concentrações mais altas como de 5 mg/mL de EPS de *E. faecium* (MS79) obteve capacidade de eliminação de 76% para esse mesmo radical (AYYASH et al., 2020). Diante disso, essa atividade antioxidant pode ocorrer devido à presença de grupos funcionais do EPS que podem doar elétrons para reduzir os radicais a uma forma mais estável ou reagir com os radicais livres, se tornando um potencial agente para explorações biotecnológicas e aditivos alimentares funcionais.

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL HIDROXILA

O radical hidroxila (OH) é considerado o mais reativo dos intermediários, formado quando H_2O_2 reage com a reação de Fenton (HALLIWELL et al., 1989). A capacidade de eliminação do radical hidroxila foi medida de acordo com a reação mencionada. O EPS 133v de *Enterococcus* sp. apresentou atividade antioxidant apenas na concentração 2 mg/mL, apresentada na figura 02 (B). Indicando que sua capacidade de eliminar o radical pode acontecer a partir dessa fração, ou seja, a concentração de EPS teria que subir para que sua capacidade antioxidant utilizando o radical hidroxila também fosse maior, mais uma vez demonstrando que o potencial antioxidant do EPS avaliado está diretamente relacionado com sua

concentração na solução. Esse é um dado relevante quando se deseja avaliar polissacarídeos para utilização em alimentos.

Ainda, esses resultados podem indicar que o EPS não obteve boa atividade sequestrante do radical em concentrações menores, provavelmente devido à baixa disponibilidade de doação de hidrogênio. Do mesmo modo que, o ácido ascórbico (controle positivo) alcançou o máximo de 51% (2 mg/mL) de capacidade de eliminação, reforçando que o radical hidroxila não apresentou sua melhor eficácia nesse ensaio.

Outros resultados mostram que o EPS de *Bacillus aerophilus* (rk1) em ensaios *in vitro* apresentaram captação do radical hidroxila a partir da concentração 0,5 mg/mL com valores acima de 20% (GANGALLA et al., 2021). Além disso, MIN et al., 2019 reportou 80% de atividade na concentração de 10 mg/mL por EPS de *L. plantarum* (JLAU103). Diante disso, é importante ressaltar que há uma correlação entre as propriedades antioxidantes do biopolímero com sua conformação, estrutura e massa molecular de seus componentes monossacarídeos, o que leva a diferentes EPSS apresentarem resultados distintos (MOHAMED et al., 2018).

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL ABTS

A atividade antioxidante utilizando o radical ABTS é amplamente utilizada para determinar a atividade antioxidante de componentes químicos (MA et al., 2018). Os resultados obtidos da atividade antioxidante do EPS 133v para o radical ABTS estão apresentados na figura 02 (C). De acordo com a figura, a atividade seguiu o padrão de correlação das avaliações anteriores utilizando outros tipos de radicais, ou seja, de forma dose-dependente. Na concentração de 0,2 mg/mL de EPS foi observado um resultado de 56%, enquanto na concentração máxima de 2,0 mg/mL apresentou 72% da capacidade de eliminar o radical ABTS, isso correspondeu a 74% e 96%, respectivamente da atividade do padrão ácido ascórbico.

De acordo com os resultados apresentado por AYYASH et al., 2020, que estudaram o EPS de *E. faecium* (MS79), na concentração de 10 mg/mL do citado EPS foi obtido uma atividade de 44%, bem inferior ao resultado apresentado pelo EPS 133v estudado, que na concentração de 2 mg/mL obteve 72% de atividade antioxidante. Ademais, MIN et al., 2019 relatou que o EPS de *L. plantarum*

(JLAU103) em concentrações menores que 2 mg/mL não ultrapassaram 30% da capacidade de eliminar o radical mencionado, e que atingiu o máximo de 65,5% na concentração de 10 mg/mL, reafirmando a relevância destes resultados para futuras aplicações. Diante disso, este ensaio do radical ABTS se torna bastante promissor, pois foi obtido um ótimo aproveitamento, mesmo em baixas concentrações, no que se diz respeito a sua capacidade antioxidante.

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO

O ânion superóxido é considerado um oxidante altamente potente que pode reagir com diversas biomoléculas, e tem potencial de causar danos aos tecidos (PAN & MEI., 2010). As concentrações de EPS 133v (*Enterococcus* sp.) estudadas foram capazes de eliminar o radical superóxido (O_2^-) acima de 40%, sendo 0,5 mg/mL a maior delas com 47% de capacidade de eliminação, conforme mostrado na figura 02 (D). O controle positivo apresentou 86% de atividade na concentração mínima (0,2 mg/mL), enquanto na máxima obteve 99% (2 mg/mL).

De acordo com ABDHUL et al., 2014, o EPS de *E. faecium* (BDU7) na concentração de 2 mg/mL, apresentou capacidade de eliminação do radical ânion superóxido abaixo dos 20%, menor quando comparamos com os resultados aqui mostrados. No entanto, os resultados desenvolvidos por ADESULU-DAHUNSI et al., 2018, que extraiu o EPS produzido por *Weissella cibaria* (GA44), utilizando o dobro da concentração (4 mg/mL), mostrou atividade antioxidante de 77%. Isso mostra que, ainda assim, há um grande potencial do EPS 133v produzido por *Enterococcus* sp. utilizado neste estudo, pois foi necessária uma baixa concentração de EPS (0,5 mg/mL) para se obter uma boa atividade sequestrante do radical em questão (47%).

Essa atividade de eliminação do radical de ânion superóxido (O_2^-) é capaz de retardar as reações de degradação oxidativa, ou seja, reduzem a velocidade da oxidação por um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres, o que indica uma fonte natural alternativa com potencial atividade antioxidante deste EPS 133v produzido por uma linhagem de *Enterococcus* sp. Sendo assim, e de acordo com a literatura consultada, os resultados obtidos para o EPS analisado são promissores não só para esse radical como também para os avaliados anteriormente e descritos nos tópicos acima.

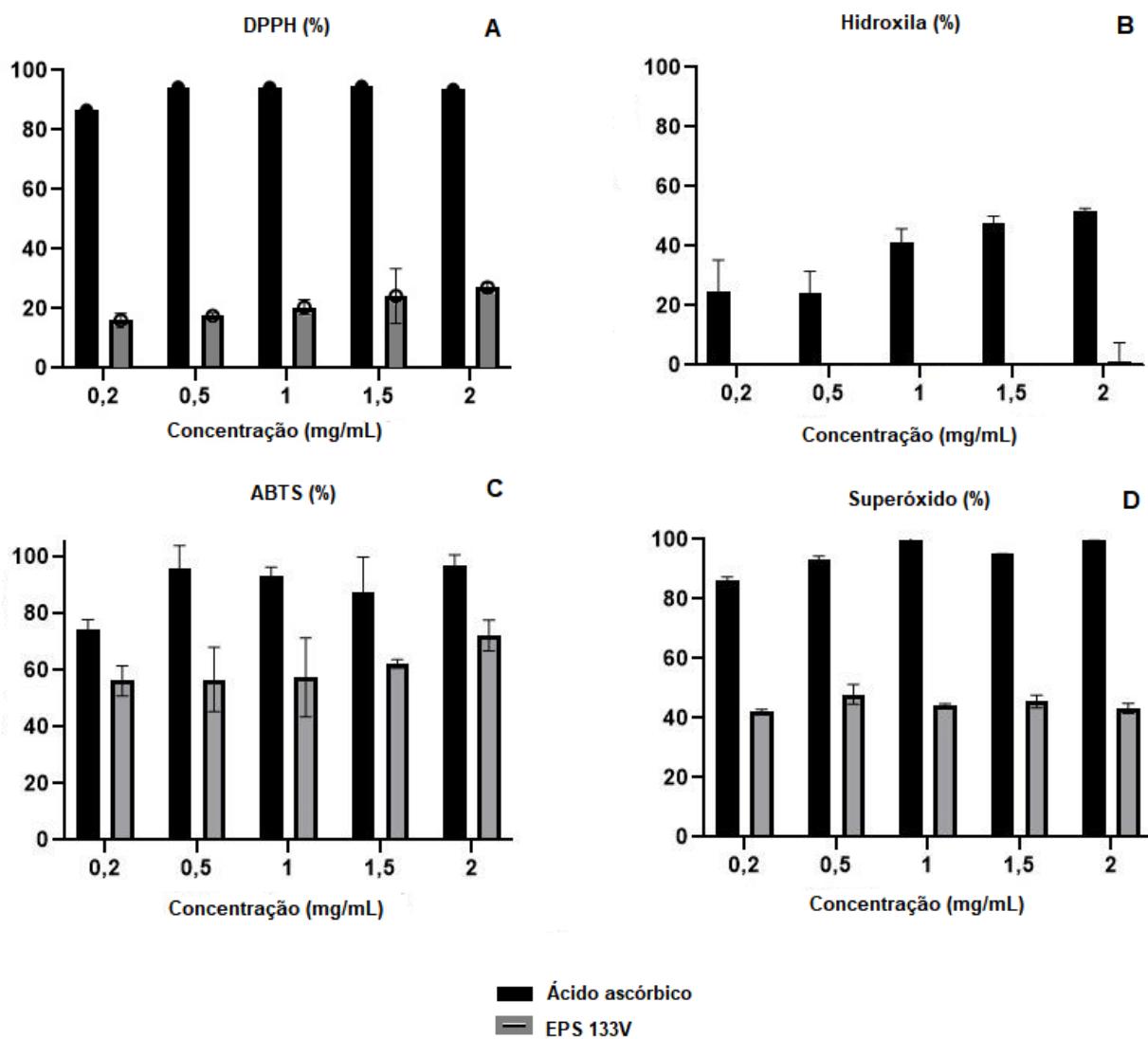


Figura 02. Atividades antioxidantes do EPS 133v (*Enterococcus sp.*). (A) Capacidade de eliminação do radical DPPH. (B) Radical hidroxila. (C) Radical ABTS. (D) Radical ânion superóxido. Ácido ascórbico como controle positivo em todos os ensaios. Os resultados apresentaram significância $p < 0,05$.

6. CONCLUSÃO

Os testes *in vitro* têm se mostrado importantes ferramentas que auxiliam na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de matéria-prima para pesquisas que substituem os produtos sintéticos e diminuem os efeitos colaterais. Nesse cenário, uma nova abordagem que represente o desenvolvimento de microrganismos exercendo atividades antioxidantes e neutralizando o estresse oxidativo no hospedeiro pode ser promissora. Os exopolissacarídeos de BAL têm alto potencial para desenvolvimento de ingredientes alimentares funcionais ou

aditivos com benefícios econômicos e para a saúde. Neste trabalho, os ensaios antioxidantes *in vitro* do EPS 133v produzido por *Enterococcus* sp. mostrou fortes propriedades antioxidantes, principalmente para os radicais DPPH, ABTS e superóxido, apresentando alto potencial de exploração biotecnológica e industrial, sobretudo no setor alimentício, o que sugere ser uma fonte natural alternativa vantajosa frente aos interesses do consumidor.

REFERÊNCIAS

- ABDHUL, Kaja *et al.* Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari. International journal of biological macromolecules, v. 70, p. 450-454, 2014.
- ADESULU-DAHUNSI, A. T.; SANNI, A. I.; JEYARAM, K. Production, characterization and in vitro antioxidant activities of exopolysaccharide from *Weissella cibaria* GA44. LWT, v. 87, p. 432-442, 2018.
- ANDREW, Mônica; JAYARAMAN, Gurunathan. Structural characteristics of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. Carbohydrate Research , v. 487, p. 107881, 2020.
- ARENA, Adriana *et al.* Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. International Immunopharmacology, v. 6, n. 1, p. 8-13, 2006.
- AYYASH, Mutamed *et al.* Physicochemical, bioactive and rheological properties of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Pediococcus pentosaceus* M41. Carbohydrate polymers, v. 229, p. 115462, 2020.
- BERGHE, Erika; WINTER, Tom; VUYST, Luc. Enterocina production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterized by a temperature-and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. International Journal of Food Microbiology, v. 107, n. 2, p. 159-170, 2006.
- BHAT, Bilqeesa; BAJAJ, Kumar. Hypocholesterolemic and bioactive potential of exopolysaccharide from a probiotic *Enterococcus faecium* K1 isolated from kalarei. Bioresource technology, v. 254, p. 264-267, 2018.
- CHANDRASEKARAN, Akshaya; IDELCHIK, Maria; MELENDEZ, Andrés. Redox control of senescence and age-related disease. Redox Biology, v. 11, p. 91-102, 2017.
- CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, Wioleta; ZADERNOWSKA, Anna; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Łucja. Diversity of antibiotic resistance genes in

Enterococcus strains isolated from ready-to-eat meat products. Journal of Food Science , v. 81, n. 11, pág. M2799-M2807, 2016.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, Wioleta; ZADERNOWSKA, Anna; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Lucja. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. LWT , v. 75, p. 670-676, 2017.

DABA, Ghoson M.; ELNAHAS, Marwa O.; ELKHATEEB, Waill A. Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. International Journal of Biological Macromolecules, v. 173, p. 79-89, 2021.

DEMAIN, Arnold. Importance of microbial natural products and the need to revitalise their discovery, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 41, n. 2, pág. 185-201, 2014.

DI, Wei et al. Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. Carbohydrate polymers, v. 171, p. 307-315, 2017.

DONOT, Florentino et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydrate Polymers, v. 87, n. 2, p. 951-962, 2012.

DOMIG, Konrad; MAYER, Helmut; KNEIFEL, Wolfgang. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 2. Pheno- and genotypic criteria. International Journal of Food Microbiology, v. 88, n. 2-3, pág. 165-188, 2003.

DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

GALLE, Sandra et al. Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. Food Microbiology, v. 28, n. 3, p. 547-553, 2011.

GANGALLA, Ravi et al. Optimization and characterization of exopolysaccharide produced by *Bacillus aerophilus* rk1 and its in vitro antioxidant activities. Journal of King Saud University-Science, v. 33, n. 5, p. 101470, 2021.

GIRAFFA, Giorgio; CARMINATI, Domenico; NEVIANI, Erasmo. *Enterococci* isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. Journal of Food Protection, v. 60, n. 6, pág. 732-738, 1997.

GUZMAN, Ana et al. Global emergence and dissemination of *enterococci* as nosocomial pathogens: attack of the clones? Frontiers in microbiology, v. 7, p. 788, 2016.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John. Free radicals in biology and medicine. Clarendon. 1989.

JIA, Kaiying *et al.* Characterization of novel exopolysaccharide of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infant and demonstration of its in vitro biological properties. International journal of biological macromolecules, v. 128, p. 710-717, 2019.

KIM, Y. *et al.* Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. Letters in applied microbiology, v. 51, n. 2, p. 123-130, 2010.

LEE, Terence *et al.* Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. Journal of global antimicrobial resistance, v. 16, p. 36-47, 2019.

LI, Yang *et al.* Extraction and biological activity of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* SN-8. International Journal of Biological Macromolecules, v. 157, p. 36-44, 2020.

LIGUORI, Ilaria *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. Clinical interventions in aging, v. 13, p. 757, 2018.

LYNCH, Kieran *et al.* Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: Isolation, properties, characterization, and health benefits. Annual review of food science and technology, v. 9, p. 155-176, 2018.

MA, Wenjin *et al.* Characterization, antioxidativity, and anti-carcinoma activity of exopolysaccharide extract from *Rhodotorula mucilaginosa* CICC 33013. Carbohydrate polymers, v. 181, p. 768-777, 2018.

MIN, Wei-Hong *et al.* Characterization and antioxidant activity of an acidic exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* JLAU103. Journal of bioscience and bioengineering, v. 127, n. 6, p. 758-766, 2019.

MOHAMED, Sahar *et al.* Characterization and applications of exopolysaccharide produced by marine *Bacillus altitudinis* MSH2014 from Ras Mohamed, Sinai, Egypt. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences, v. 5, n. 3, p. 204-209, 2018.

MORADI, Mehran; GUIMARÃES, Jonas; SAHIN, Serpil. Current applications of exopolysaccharides from lactic acid bacteria in the development of food active edible packaging. Current Opinion in Food Science, v. 40, p. 33-39, 2021.

NASCIMENTO, Liane. Seleção de novas linhagens de bactérias ácido-láticas probióticas e aplicação de *E. faecium* em leite. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" São José do Rio Preto-SP, 2017.

NEHAL, Fátima *et al.* Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou. Microbial Pathogenesis, v. 132, p. 10-19, 2019.

PAN, Daodong; MEI, Xiuming. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, n. 3, p. 908-914, 2010.

PEREIRAA, Gilberto *et al.* Bioactive Polysaccharides Produced by Microorganisms: Production and Applications. High Value Fermentation Products (Scrivener Publishing, Wiley, eds.), p. 231-251, 2019.

PORTER, Nathan; MARTENS, Eric. The critical roles of polysaccharides in gut microbial ecology and physiology. *Annual review of microbiology*, v. 71, p. 349-369, 2017.

PV, Behare *et al.* Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: a review. *J Food Sci Technol*, v. 46, n. 1, p. 1-11, 2009.

REDONDO, Nadia. Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* spp *jugurti* 416. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2008. 109 p.

SAADAT, Yalda; KHOSROUSHABI, Ahmad; GARGARI, Bahram. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 217, p. 79-89, 2019.

SANTOS, Dayane *et al.* What differentiates probiotic from pathogenic bacteria? The genetic mobility of *Enterococcus faecium* offers new molecular insights. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, v. 24, n. 12, p. 706-713, 2020.

SHIMADA, Kazuko *et al.* Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 40, n. 6, p. 945-948, 1992.

SINGH, Rajendra *et al.* Microbial metabolites in nutrition, health and agriculture. *3 Biotech*, v. 7, n. 1, page 1-14, 2017.

TANG, Weizhi *et al.* Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1. *Carbohydrate Polymers*, v. 173, p. 654-664, 2017.

WANG, Ji *et al.* Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International journal of biological macromolecules*, v. 74, p. 119-126, 2015.

WANG, Zhi-Jun *et al.* Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides. *Food & function*, v. 8, n. 3, p. 915-926, 2017.

WANG, Xin *et al.* Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 103, p. 1173-1184, 2017.

WEI, Chaoyang *et al.* Structure characterization and biological activities of a pectic polysaccharide from cupule of *Castanea henryi*. International journal of biological macromolecules, v. 109, p. 65-75, 2018.

XU, Yuanmei *et al.* Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physicochemical functions and applications in the food industry. Food Hydrocolloids, v. 94, p. 475-499, 2019.

ZIARNO, Małgorzata. *Enterococcus* bacteria in milk and dairy products. Veterinary Medicine, v. 62, n. 02, p. 145-148, 2006.

ZHANG, Li *et al.* Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. International Journal of Biological Macromolecules, v. 54, p. 270-275, 2013.

ZHOU, Yang *et al.* Structure, physicochemical characterization, and antioxidant activity of the highly arabinose-branched exopolysaccharide EPS-M2 from *Streptococcus thermophilus* CS6. International Journal of Biological Macromolecules, v. 192, p. 716-727, 2021.