



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES DE *Ensifer meliloti*

YURI FREITAS MASTROIANO

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert

Orientador

Prof. Dr. Mariano Michelin

Coorientador

Rio Grande, RS

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES DE *Ensifer meliloti*

YURI FREITAS MASTROIANO

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de mestre
em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert

Orientador

Prof. Dr. Mariano Michelin

Coorientador

Rio Grande, RS

2023

Ficha Catalográfica

M423a Mastroiano, Yuri Freitas.

Avaliação da recuperação e da atividade antioxidante de substâncias poliméricas extracelulares de *Ensifer meliloti* / Yuri Freitas Mastroiano. – 2023.

93 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2023.

Orientador: Dr. Carlos André Veiga Burkert.

Coorientador: Dr. Mariano Michelin.

1. Exopolissacarídeos 2. Bactérias Diazotróficas 3. Precipitação
4. Antioxidantes I. Burkertm, Carlos André Veiga II. Michelin, Mariano
III. Título.

CDU 338.45

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Yuri Freitas Mastroiano e aprovada em 28 de junho de 2023, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Documento assinado digitalmente
 CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT
Data: 28/06/2023 11:50:32-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert– FURG

Documento assinado digitalmente
 ANELISE CHRIST RIBEIRO
Data: 01/07/2023 11:25:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Anelise Christ Ribeiro- FURG

Documento assinado digitalmente
 JAQUELINE GARDÁ BUFFON
Data: 30/06/2023 10:20:29-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Jaqueline Gardá Buffon - FURG

Documento assinado digitalmente
 CELIA FRANCISCA CENTENO DA ROSA
Data: 28/06/2023 12:06:24-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Célia Francisca Centeno da Rosa - UFPel

Dedico este trabalho aos meus pais Daniel e Ana Cristina, que com muito amor e companheirismo me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por guiar meus passos no decorrer desta caminhada. Que toda a honra e a glória venham ser dada à Aquele que é digno de toda adoração.

Aos meus pais, Daniel e Ana Cristina, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida, mesmo estando tão distantes.

À minha colega e amiga Luana (amadinha) que durante este período conviveu diariamente comigo e em momento algum deixou que eu me sentisse sozinho. Obrigado pelo cuidado que teve comigo e pela parceria.

À minha colega Sandra agradeço a parceria e amizade, pois foram centenas de trabalhos realizados juntos mesmo à distância.

Quero também agradecer aos colegas Jandler e Joice do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (ENGBIO), cujo esforços e auxílio tornaram possível a concretização deste projeto.

Ao meu orientador, Prof. Carlos André, pela acolhida no laboratório mesmo em tempos pandêmicos. Agradeço pela paciência e ensinamentos compartilhados durante a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Mariano, pela confiança, paciência e ensinamentos compartilhados.

À Prof. Anelise, pela paciência e por prontamente me ajudar sempre que a procurei,

Aos professores que aceitaram compor a banca, enriquecendo este momento tão esperado.

À Universidade Federal do Rio Grande (FURG), pelo ensino de qualidade, público e gratuito.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências dos Alimentos. Aos professores que compartilharam seus conhecimentos durante esta caminhada. À secretária Juliana, pelo pronto atendimento sempre que solicitado, inúmeras vezes via WhatsApp.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro (código financeiro 001) durante todo o meu mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo auxílio financeiro (termo de outorga 19/2551-0001719-7).

Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado.

(Gandalf, O Senhor dos Anéis: A Sociedade do Anel, 2001).

RESUMO

As substâncias poliméricas extracelulares (SPE), constituídas predominantemente por polissacarídeos, além de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e substâncias húmicas, são sintetizadas por uma diversidade de micro-organismos, incluindo as bactérias diazotróficas, responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio. A produção de SPE microbianas tem sido intensamente estudada devido à ampla aplicação do bioproduto na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, nas quais são utilizadas, principalmente, como agentes espessantes, estabilizantes e encapsulantes. Estudos recentes evidenciam ainda que as propriedades de SPE não se limitam apenas a aplicações tecnológicas, mas também incluem suas potencialidades biológicas, como a capacidade de atuarem como agentes antitumorais, anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos, entre outras. Partindo deste pressuposto, o presente estudo teve por objetivo recuperar SPE produzidas por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 e avaliar características estruturais e a atividade antioxidante. Os cultivos foram realizados em frascos agitados durante 96 h a 200 rpm e 30 °C, utilizando o melaço de soja como fonte de carbono na presença ou ausência de iluminação, obtida por diodos emissores de luz azul (LED) com intensidade de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Nos ensaios de recuperação das SPE por precipitação, diferentes agentes de precipitação (etanol e isopropanol), proporções de sobrenadante:solvente (1:1, 1:3 e 1:5) e temperatura (10 °C e 25 °C) foram testados. Etanol na proporção de 1:3 a 25 °C foi a condição estabelecida para ambas SPE obtidas nos cultivos sem e com iluminação. As SPE recuperadas dos cultivos nas condições estabelecidas de precipitação foram caracterizadas quanto ao conteúdo de carbono e nitrogênio e através de FTIR-ATR. Os resultados mostraram a presença de grupos funcionais típicos de polissacarídeos de bactérias diazotróficas, indicando uma similaridade estrutural entre a amostra de SPE obtida através do cultivo com LED azul e o cultivo sem iluminação. As amostras de SPE foram avaliadas também quanto à atividade antioxidante, por meio dos métodos de captura dos radicais ABTS[•] e DPPH[•] e pelo poder redutor. Os resultados confirmaram as propriedades antioxidantes das SPE, obtendo-se valores próximos ao padrão ácido ascórbico (86,61%) para DPPH[•] (80,47% e 80,82%, para cultivos sem e com iluminação, respectivamente). A concentração da SPE impactou a atividade antioxidante em todos os métodos, também não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparados os cultivos sem e com iluminação (DPPH[•]). Entretanto, para ABTS[•] e poder redutor, as SPE diferiram significativamente ($p < 0,05$). Dessa forma, o micro-organismo testado no presente estudo mostra ser uma fonte promissora para obtenção de SPE com potencial atividade antioxidante.

Palavras-chaves: Exopolissacarídeos. Bactérias Diazotróficas. Precipitação. Antioxidantes.

ABSTRACT

Extracellular polymeric substances (EPS), consisting predominantly of polysaccharides, in addition to proteins, nucleic acids, lipids and humic substances, are synthesized by a variety of microorganisms, including diazotrophic bacteria, responsible for biological nitrogen fixation. The production of microbial EPS has been intensely studied due to the extensive application of the bioproduct in the pharmaceutical, cosmetic and food industries, in which they are mainly used as thickening, stabilizing and encapsulating agents. Recent studies also show that the properties of EPS are not limited to technological applications, but also include their biological potential, such as the ability to act as antitumor, anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial agents, among others. Based on this assumption, the present study aimed to recover EPS produced by *Ensifer meliloti* SEMIA 135 and to evaluate structural characteristics and antioxidant activity. The cultivations were carried out in shaken flasks for 96 h at 200 rpm and 30 °C, using soybean molasses as a carbon source in the presence or absence of lighting, obtained by blue light emitting diodes (LED) with an intensity of 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. In the EPS recovery assays, different precipitation agents (ethanol and isopropanol), supernatant:solvent ratios (1:1, 1:3 and 1:5) and temperature (10 °C and 25 °C) were tested. Ethanol in the proportion of 1:3 at 25 °C was the established condition, for both EPS obtained in the cultivation with and without lighting. The EPS recovered from cultivations with and without lighting under established precipitation conditions were characterized by carbon and nitrogen content and through FTIR-ATR. The results showed the presence of typical functional groups of polysaccharides from diazotrophic bacteria, indicating a structural similarity between the EPS sample obtained through cultivation with blue light emitting diodes and without lighting. The EPS samples were also evaluated for their antioxidant activity, using the methods of scavenging ABTS• and DPPH• radicals and their reducing power. The results confirmed the antioxidant properties of EPS, obtaining values close to ascorbic acid (86.61%) for DPPH• (80.47% and 80.82% for cultivations without and with lighting, respectively). The concentration of EPS impacted the antioxidant activity in all methods, with no significant differences ($p>0.05$) when comparing cultures without and with lighting (DPPH•). However, for ABTS• reducing power, EPS were significantly different ($p<0.05$). Thus, the microorganism tested in the present study appears to be a promising source for obtaining EPS with potential antioxidant activity.

Keywords: Exopolysaccharides. Diazotrophic Bacteria. Precipitation. Antioxidants.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes estruturais de EPS e suas atividades antioxidantes.....	45
Tabela 2 – Recuperação de SPE (%)* produzidas no cultivo controle utilizando etanol como solvente em diferentes condições.....	57
Tabela 3 – Recuperação de SPE (%)* produzidas no cultivo controle utilizando isopropanol como solvente.....	58
Tabela 4 – Recuperação de SPE (%)* produzidas no cultivo controle utilizando isopropanol ou etanol como solvente.....	59
Tabela 5 – Recuperação de SPE (%)* produzidas em cultivo com iluminação (LED azul) a 25°C na proporção sobrenadante:solvente: 1:3.....	60
Tabela 6 – Teores de C, N e H nas amostras de SPE produzidas em diferentes condições de cultivo.....	61
Tabela 7 – Atividade antioxidante (%) das suspensões de SPE de <i>E. meliloti</i> SEMIA 135 pelo método do sequestro do radical DPPH*.....	65
Tabela 8 – Atividade antioxidante (%) das suspensões de SPE de <i>E. meliloti</i> SEMIA 135 pelo método do sequestro do radical ABTS*.....	68
Tabela 9 – Atividade antioxidante (%) das suspensões de SPE de <i>E. meliloti</i> SEMIA 135 pelo método do poder redutor.....	71

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – EPS produzidos por <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (A) e <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 4S (B)	34
Figura 2 – Reação química do radical DPPH [•] com um antioxidante RH.....	42
Figura 3 – Redução do ABTS [•] por um antioxidante.....	43
Figura 4 – Fluxograma das etapas executadas na produção das SPE.....	49
Figura 5 – Tubos <i>Falcon</i> contendo as amostras para centrifugação.....	56
Figura 6 – Placas de Petri contendo as SPE precipitadas do sobrenadante.	56
Figura 7 – Espectro de absorção no infravermelho para a amostra de SPE obtidas no cultivo controle e na presença de luz.....	61
Figura 8 – Ensaio de atividade antioxidante das suspensões contendo SPE de <i>E. meliloti</i> SEMIA 135 baseada no sequestro do radical DPPH [•]	63
Figura 9 – Ensaio de atividade antioxidante das suspensões contendo SPE de <i>E. meliloti</i> SEMIA 135 baseada no sequestro do radical ABTS [•]	68
Figura 10 – Ensaio de atividade antioxidante das suspensões contendo SPE de <i>E. meliloti</i> SEMIA 135 baseada no poder redutor sobre íons ferricianeto.....	70

NOMENCLATURA

SÍMBOLO

DEFINIÇÃO

SPE

Substâncias Poliméricas Extracelulares

EPS

Exopolissacarídeos

BFN

Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

FBN

Fixação Biológica de Nitrogênio

DPPH•

2,2- difenil-1-picril-hidrazil

ABTS•

Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE TABELAS.....	17
LISTAS DE FIGURAS	19
NOMENCLATURA.....	20
1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 REVISÃO DA LITERATURA	32
3.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	32
3.2 SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (SPE)	33
3.3 MELAÇO DE SOJA	36
3.4 CULTIVOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS	37
3.5 RECUPERAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS.....	39
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXOPOLISSACARÍDEOS.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 MATERIAL.....	48
4.1.1 Micro-organismos.....	48
4.1.2 Melaço de soja	48
4.2 MÉTODOS.....	48
4.2.1 Manutenção da cultura bacteriana.....	50
4.2.2 Preparo do inóculo	50
4.2.3 Cultivos em frascos agitados	50

4.2.4 Recuperação das SPE	51
4.2.5 Caracterização Parcial das Substâncias Poliméricas Extracelulares	51
4.2.5.1 Análise elementar de carbono, nitrogênio e hidrogênio	52
4.2.5.2 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)	52
4.2.6 Atividade Antioxidante	52
4.2.6.1 Sequestro do radical DPPH [•]	52
4.2.6.2 Sequestro do radical ABTS [•]	53
4.2.6.3 Poder redutor	54
4.2.7 Análise Estatística	54
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 56
5.1 ESTUDO DA PRECIPITAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES	56
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES .	60
5.2.1 Análise de CHN	60
5.2.2 Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)	61
5.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	63
5.3.1 Sequestro do radical DPPH[•]	63
5.3.2 Sequestro do radical ABTS[•]	67
5.3.3 Poder redutor	70
 6 CONCLUSÃO	 73
 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	 77
 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 78
 9 APÊNDICES	 91
APÊNDICE A – Valores médios (n=3) em transmitância ao longo do tempo (min) para DPPH.....	91
APÊNDICE B – Valores médios (n=3) em transmitância ao longo do tempo (min) para ABTS.....	92

1. INTRODUÇÃO

As substâncias poliméricas extracelulares (SPE) secretadas por vários micro-organismos, principalmente bactérias, são constituídas basicamente por carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e substâncias húmicas, em diferentes concentrações e formas, sendo os exopolissacarídeos (EPS) os constituintes mais abundantes da matriz estrutural (FLEMMING, 2016). As aplicações de EPS bacterianos abrangem diversos segmentos industriais, como a indústria de alimentos, devido à sua capacidade de atuação como agentes espessantes, estabilizantes e encapsulantes (FREITAS; ALVES; REIS, 2011).

Gelana e xantana são exemplos de EPS empregados na indústria alimentícia. A goma gelana é muito atrativa devido à sua alta capacidade de formação de géis em baixas concentrações e na presença de alguns cátions (ELLIS et al., 2017). É um biomaterial aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e usado na estabilização de produtos de confeitaria, compotas, géis à base de água e laticínios (sorvetes, iogurtes, *milk-shakes*, leite gelificado e bebidas lácteas ácidas) (DANALACHE et al., 2015). Além disso, é utilizada como emulsificante, estabilizante, aglutinante, gelificante, coagulante, lubrificante, formadora de filme e espessante (DOLAN et al., 2016). A goma xantana é utilizada na indústria alimentícia como agente espessante e estabilizante em suspensões e emulsões, atuando como substituta de clara de ovos, em molhos prontos, congelados, sucos de frutas, coquetéis e sobremesas instantâneas. É utilizada como estabilizante em sorvetes, adicionando corpo e prevenindo a aderência em géis de frutas (ADITIVOS INGREDIENTES, 2015).

Por outro lado, alguns EPS são utilizados no âmbito farmacológico devido às suas propriedades biológicas, tais como levana, ácido hialurônico e celulose bacteriana, que podem ser utilizados como agentes ativos nas formulações de produtos, visto que possuem funcionalidades na proteção e regeneração da pele (SILVA, 2019).

Logo, a seleção e o isolamento de micro-organismos produtores de EPS, bem como a caracterização das moléculas produzidas, representam uma importante estratégia para o desenvolvimento de novos ingredientes e processos de produção. De acordo com Pessoa et al. (2019), o interesse em recursos renováveis tem conduzido à expansão do mercado dos EPS microbianos, os quais vêm sendo intensamente estudados devido às suas aplicações biológicas e tecnológicas, associadas à sua estrutura característica e às propriedades reológicas.

Em relação às aplicações biológicas destas macromoléculas, destaca-se a capacidade de apresentarem bioatividade, incluindo atividades imunomoduladoras, antitumorais, anti-

inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, anti-ulcerativas e ainda podendo atuar na redução dos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes (PESSÔA et al., 2019). Recentemente, pesquisadores têm avaliado a capacidade antioxidante e antimicrobiana de EPS oriundos de diversos micro-organismos, incluindo fungos e bactérias, tais como *Termitomyces albuminosus* (ZHAO et al., 2017), *Aeromonas* spp. (FREIRE et al., 2018), *Lactobacillus plantarum* SP8 (ZHANG et al., 2020) e *Enterococcus faecium* MS79 (AYYASH et al., 2020).

No entanto, para a produção industrial destes biopolímeros, se faz necessário o desenvolvimento de novos processos economicamente viáveis que tenham por objetivo a redução dos custos dos meios de cultura e do tempo de cultivo, buscando fontes de carbono alternativas e de baixo custo, tais como coprodutos e resíduos industriais. O Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) vêm estudando desde 2012 a produção e a caracterização de EPS oriundos de bactérias diazotróficas, explorando novos meios de cultivos a partir do emprego de substratos renováveis e de origem agroindustrial, como coprodutos lácteos (GONZÁLEZ, 2019), glicerol residual (OLIVEIRA, 2017), melaço de soja (OLIVEIRA, 2021; SANTOS, 2022) e hidrolisado de casca de soja (ROESLER, 2021). Neste contexto, o melaço de soja é considerado um coproduto agroindustrial de baixo custo, gerado na obtenção de proteína concentrada de soja via extração alcoólica, que tem demonstrado um elevado potencial biotecnológico para o cultivo de bactérias diazotróficas (OLIVEIRA; MICHELON; BURKERT, 2020), possibilitando a redução de custos com meio de cultivo, além de contribuir de forma sustentável com o meio ambiente (PECIN, 2018).

Nesta perspectiva, recente estudo no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) indicou a potencialidade do cultivo empregando iluminação com diodos emissores de luz (LED, da sigla em inglês) na cor azul (OLIVEIRA, 2021). No referido estudo, a aplicação do LED azul ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) nas primeiras 24 h de cultivo (fase exponencial) de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 em meio à base de melaço de soja resultou em um incremento da produção de SPE de 3,17 g/L em 96 h (cultivo sem iluminação) para 4,79 g/L em 72 h. Segundo Bonomi et al. (2011), a presença de luz azul no meio de cultivo representa um importante estímulo ambiental que controla as respostas adaptativas e a eficiência simbiótica de *R. leguminosarum*, contribuindo para o crescimento do micro-organismo e para a produção de EPS.

Um fator importante a ser considerado é o método de recuperação destas biomoléculas a partir do sobrenadante, usualmente utilizando-se precipitação por solventes orgânicos. Etanol e isopropanol são solventes amplamente utilizados, promovendo associações intramoleculares

entre moléculas de biopolímeros pela redução da constante dielétrica do meio (LIU et al., 2016). A recuperação da xantana, um biopolímero de origem bacteriana, é realizada pela diminuição da solubilidade do coloide dissolvido, utilizando solventes orgânicos como etanol e isopropanol (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Diversas pesquisas utilizam etanol como agente precipitante de distintos EPS (DILNA et al., 2015; RAJOKA et al., 2020; WANG et al., 2015; ZAROOUR et al., 2017). A adição de etanol modifica a constante dielétrica de forma tal que os polissacarídeos perdem a estabilidade e precipitam. A baixa temperatura facilita a precipitação e dificulta a redissolução (PIERMARIA, 2008). As condições de precipitação destas macromoléculas, tais como temperatura, tipo e volume de solvente, podem influenciar a eficiência de recuperação (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; LIU et al., 2016). Para García-Ochoa et al. (2000), álcoois devem ser adicionados ao caldo fermentado não somente para diminuir a solubilidade do EPS no meio, mas também para a remoção de impurezas como componentes coloridos, sais e células. No entanto, estudos com SPE oriundas de bactérias diazotróficas visando maximizar a recuperação e/ou reduzir custos operacionais são escassos na literatura.

Por outro lado, polissacarídeos e seus complexos extraídos de diversas fontes naturais têm recebido atenção devido às suas atividades farmacológicas, como atividade antioxidante, com potenciais usos em alimentos, nutracêuticos e fármacos (WANG et al., 2016). A busca por antioxidantes naturais e de origem biológica tem recebido grande visibilidade nos últimos anos, sendo os EPS exemplos de substâncias naturais que podem substituir os antioxidantes de origem sintética. De acordo com a literatura, os EPS produzidos por via microbiana apresentam baixa citotoxicidade e baixos efeitos colaterais, tornando-os boas alternativas na aplicação da imunoterapia contra o câncer e como agente antioxidante natural em alimentos funcionais (FENG et al., 2021).

De acordo com Wang et al. (2017), estudos *in vitro* evidenciam a capacidade antioxidante de EPS microbianos, oriunda de sua ação benéfica contra os agentes causadores do estresse oxidativo aliado à segurança e baixa toxicidade que geralmente apresentam, havendo muitos estudos relacionados a aqueles oriundos de bactérias lácticas (LI et al., 2014; TANG et al., 2017; BOMFIM et al., 2020), entre outras. No entanto, para EPS rizobianos, são inexistentes os estudos abordando a sua capacidade antioxidante.

Desta forma, o presente estudo vem contribuir na elucidação de alguns aspectos envolvidos na recuperação de SPE de *E. meliloti* SEMIA 135, bem como na sua potencialidade quanto à atividade antioxidante *in vitro*, considerando que as novas tendências em torno de uma alimentação saudável despertam novas perspectivas para a aplicação de biopolímeros

microbianos que, além do papel tecnológico que exercem, possam atuar como ingredientes funcionais em alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Recuperar substâncias poliméricas extracelulares (SPE) produzidas por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 e avaliar sua atividade antioxidante *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produzir SPE a partir da bactéria *E. meliloti* SEMIA 135, utilizando como fonte de carbono o melaço de soja, na presença e ausência de diodos emissores de luz (LED) na cor azul;

Avaliar diferentes solventes, proporções de sobrenadante:solvente e temperatura para a recuperação de SPE;

Caracterizar as SPE produzidas quanto à sua composição em termos de conteúdos de carbono, nitrogênio, hidrogênio e espectro de FT-IR;

Avaliar as suspensões aquosas de SPE produzidas por *E. meliloti* SEMIA 135 quanto à atividade antioxidante.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

As bactérias diazotróficas são micro-organismos que possuem a capacidade de converterem nitrogênio (N_2) atmosférico em íons amônio (NH_4^+), que passam a ser utilizados pelas raízes de plantas, promovendo desta forma a obtenção de nutrientes que são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento do vegetal, além de fornecer proteção em relação ao ambiente externo (MONTEIRO et al., 2012).

Os micro-organismos diazotróficos podem viver de forma independente no solo ou em simbiose com outras plantas. De acordo com a literatura, em grande parte das associações simbióticas, os rizóbios se estabelecem e se multiplicam no interior de estruturas nodulares (leguminosas), as quais além de abrigar as bactérias disponibilizam um ambiente limitado de oxigênio que possibilita a fixação biológica do nitrogênio (o oxigênio atua inativando a enzima nitrogenase, que converte N_2 em amônia). No entanto, em espécies que não há formação de nódulos, as bactérias diazotróficas se encontram nas raízes da planta (gramíneas) (SEMPREBOM, 2018).

Neste contexto, as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) são responsáveis pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), consistindo uma possível alternativa de aumentar a disponibilidade de nitrogênio em agro ecossistemas, pois segundo estudos as BFN são a principal via de incorporação de nitrogênio no ecossistema, que é regularmente reciclado, voltando à atmosfera por intermédio da ação de outros organismos decompositores de matéria orgânica presente no solo (SILVESTRE, 2017).

De acordo com dados da Embrapa (2020), estima-se que a FBN contribua para distintos ecossistemas em média 258 milhões de toneladas de nitrogênio no mundo ao ano, evidenciando a importância ambiental e econômica destes micro-organismos, tendo visto que a FBN mantém os ecossistemas em equilíbrio, contribuindo assim para a não contaminação das águas e do solo por resíduos nitrogenados oriundos de processos industriais de fixação de nitrogênio (SERRATO, 2008).

No entanto, além de serem responsáveis pela FBN, alguns destes micro-organismos têm a capacidade de promover o crescimento vegetal por intermédio da solubilização de fosfatos minerais e demais nutrientes do solo, atuando diretamente na produção ou na alteração da concentração de hormônios vegetais (ROESCH, 2003).

As BFN podem ser subdividas em três grupos: (i) as diazotróficas de vida livre, que são responsáveis pela FBN apenas para o seu uso próprio; (ii) as diazotróficas associativas, que auxiliam no crescimento vegetal, sem que ocorra simbiose; e (iii) as diazotróficas simbióticas, que estimulam a formação de estruturas diferenciadas, chamadas de nódulos, aos quais é fixado o nitrogênio atmosférico, enquanto as plantas providenciam compostos de carbono (MARIN et al., 1999).

Os micro-organismos diazotróficos fazem parte de uma ampla gama de micro-organismos procariotos, tais como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, possuindo uma vasta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Ensifer meliloti é uma rizobactéria Gram-negativa que fixa nitrogênio atmosférico e produz principalmente dois EPS diferentes, chamados de EPS I (succinoglicana) e EPS II (galactoglicana), que possuem diferentes funções no processo simbiótico. É responsável por estabelecer uma simbiose de nódulo radicular com plantas leguminosas, como a alfafa, mas também com outras leguminosas hospedeiras de *E. meliloti*, como *Melilotus alba* (PRIMO et al., 2020).

3.2 SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (SPE)

As SPE são definidas como compostos orgânicos de origem microbiana, constituídas majoritariamente por polissacarídeos, embora possam conter outras biomoléculas, como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, fosfolipídios e diversos compostos orgânicos com diferentes grupos funcionais, como substâncias húmicas. As proteínas e os carboidratos correspondem em média a 75-90% da composição química das SPE (SHI et al., 2017).

Os exopolissacarídeos (EPS) são os constituintes predominantes das SPE, sendo os EPS definidos como macromoléculas naturais formadas por monômeros de monossacarídeos que se ligam entre si por ligações glicosídicas, resultando em moléculas orgânicas de cadeias maiores. Dentro do setor industrial, os EPS possuem grande aplicação na indústria de alimentos, devido algumas propriedades desejáveis, em termos de textura e viscosidade que estes compostos conferem quando empregados em alimentos processados, além de não apresentarem toxicidade (PEREIRA et al., 2019).

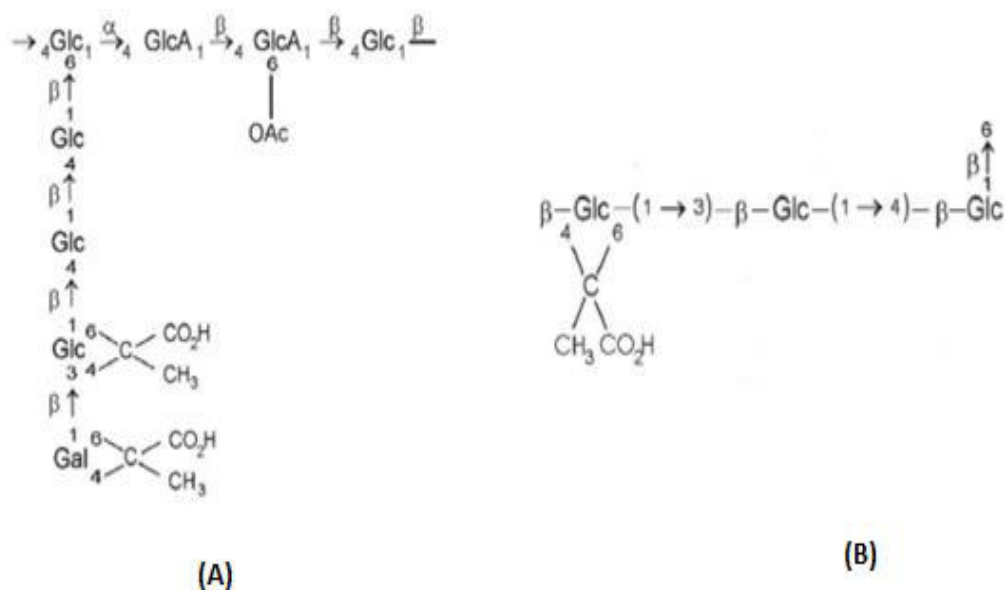
Dentre as suas principais funções, destacam-se a utilização como agentes espessantes, gelificantes, estabilizantes e encapsulantes, sendo estas propriedades provenientes de sua alta capacidade de suspensão em meio aquoso, tornando-se muito difundidos não somente na formulação de produtos alimentícios, mas em outros setores, tais como a indústria farmacêutica e cosmética (PEREIRA et al., 2019).

Na indústria farmacêutica, a busca por EPS tem sido de extrema importância devido às propriedades biológicas que estes compostos desempenham na saúde humana, atuando, por exemplo, com ação antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, anti-ulcerativa, como imunomoduladores e na redução do colesterol (KAGIMURA et al., 2015). Já entre as suas funções biológicas destacam-se, por exemplo, o seu papel na formação de biofilmes microbianos, absorção de nutrientes e de metais pesados e a solubilização de produtos orgânicos hidrofóbicos. Possuem também outra função de extrema importância que é a de barreira mecânica contra a dessecação da célula microbiana (EKKELHOF; MELKONIAN, 2017).

Os polissacarídeos de origem microbiana possuem ainda algumas vantagens em relação à sua obtenção se comparados com outras gomas vegetais. Por exemplo, não dependem de fatores climáticos, possuem menor tempo de produção e necessitam de espaços físicos relativamente pequenos para a sua obtenção. De acordo com Faria (2002), as gomas de origem microbiana apresentam maior uniformidade no processo de produção, em virtude da especificidade do micro-organismo empregado, possibilitando um controle rígido dos parâmetros do cultivo microbiano, tais como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de cultivo e composição do meio de cultura.

Na Figura 1 são apresentadas estruturas de EPS produzidos por rizóbios de mesma espécie, mas de diferentes linhagens, demonstrando diferenças estruturais, tanto no conteúdo de açúcares como no comprimento da cadeia lateral (SKORUPSKA et al., 2006)

Figura 1 – EPS produzidos por *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (A) e *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S (B)



(A) Glc: glicose; GlcA: ácido glicurônico; Gal: galactose

(B) Glc: glicose

Fonte: SKORUPSKA et al. (2006).

Os EPS produzidos por diferentes linhagens de rizóbios podem ser classificados em dois tipos principais: as succinoglicanas, que são constituídas por unidades repetidas de glicose com resíduos de galactose na razão molar 7:1, unidos por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 3), β (1 $\rightarrow$ 4) e β (1 $\rightarrow$ 6); e as galactoglicanas, que são polímeros formados por unidades dissacarídicas, unidas por ligações glicosídicas do tipo α (1 $\rightarrow$ 3) e β (1 $\rightarrow$ 3) (ZEVENHUIZEN, 1997).

Segundo Schmid, Sieber e Rehm (2015), essas diferenças estruturais podem ser oriundas dos genes dos micro-organismos envolvidos, bem como dos complexos enzimáticos, que acabam acarretando diferenças tanto no metabolismo como na forma de interagir com os meios e substratos. Karr et al. (2000) afirmam que a composição dos EPS varia não somente em virtude dos diferentes gêneros, mas também em função de mudanças nas condições de cultivo.

Sousa et al. (2019) avaliaram a ação da enzima xantana liase na modificação de polissacarídeos produzidos por três diferentes linhagens de *Rhizobium* spp. utilizando a sacarose como fonte de carbono, a fim de analisar a influência desta enzima comercial na estrutura destes EPS em comparação com o biopolímero nativo. Ao avaliarem a

composição química dos monossacarídeos presentes no polissacarídeo nativo de rizóbios, os pesquisadores verificaram a presença de glicose, galactose, manose, ramnose, ácido galacturônico e ácido glicurônico. No entanto, quando estes analisaram a composição do EPS modificado pela enzima xantana liase, perceberam que a enzima removeu o ácido glicurônico da estrutura, evidenciando que é possível produzir um heteropolissacarídeo modificado de rizóbio com propriedades diferentes através da ação enzimática.

3.3 MELAÇO DE SOJA

O melaço de soja é um subproduto do processamento da soja que apresenta textura viscosa, coloração marrom escura e sabor agridoce, sendo obtido durante o processo de obtenção do extrato proteico da soja e da proteína concentrada de soja, sendo uma fonte de carbono de baixo custo (LOMAN; JU, 2016).

Em termos de composição química, o melaço de soja é um substrato complexo, formado por açúcares assimiláveis e não-assimiláveis, proteínas, lipídios, fibras e cinzas (GOMES, 2017), sendo os carboidratos presentes no melaço de soja divididos em três grandes grupos: oligossacarídeos de rafinose, dissacarídeos e monossacarídeos em diferentes concentrações (MANTOVANI, 2013). Segundo Siqueira et al. (2008), o melaço de soja é composto principalmente pelos seguintes carboidratos: sacarose (28,4%), estaquiose (18,6%) e rafinose (9,68%), além de lipídios (21,2%), proteínas (9,44%), fibras (5,7%) e cinzas (6,36%).

No entanto, os oligossacarídeos de rafinose são considerados fatores anti-nutricionais devido à sua capacidade de interferir na absorção de nutrientes na dieta de humanos e animais monogástricos, tendo em vista que não possuem a enzima α -galactosidase que é capaz de hidrolisar as ligações α (1 $\rightarrow$ 6) presentes nestes açúcares não digeríveis (VIANA et al., 2007).

Além disso, a literatura científica apresenta vários estudos que utilizam o melaço de soja como substrato para a produção de vários produtos, como etanol (ROMÃO et al., 2012), lipase (MORAIS JÚNIOR et al., 2016), ácido acético (MIRANDA, 2017), ácido propiônico (YANG et al., 2018) e biogás (RODRIGUES, 2019), demonstrando sua aplicabilidade em processos biotecnológicos.

3.4 CULTIVOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

A produção de SPE por rizóbios é influenciada por alguns fatores que devem ser levados em consideração, dentre eles a seleção da linhagem microbiana bem como as condições operacionais (agitação e taxa de aeração, tempo de incubação, temperatura, pH, volume e idade do inóculo e composição do meio de cultivo) que atuam diretamente na síntese, rendimento e composição química (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012). A composição do meio de cultivo, por exemplo, é um fator essencial na síntese de SPE, pois diferentes fontes de carbono, nitrogênio e potássio podem ser empregadas para o crescimento do micro-organismo (RIBEIRO; BURKERT, 2016).

Forte e Garcia (2018) avaliaram em seus estudos o efeito de diferentes fontes de carbono (manitol, glicose, galactose, lactose e glicerol) no crescimento de um isolado de rizóbio (*Rhizobium* sp. S11). O crescimento foi determinado pela medição da densidade óptica e pela taxa específica de crescimento. De acordo com os autores, o maior crescimento de *Rhizobium* sp. S11 ocorreu no meio contendo o manitol como fonte de carbono em um período de 8 a 24 h. A lactose promoveu o crescimento do micro-organismo com menor produtividade. Glicerol e glicose também promoveram de forma significativa o crescimento da *Rhizobium* sp. S11.

Vieira et al. (2020) avaliaram as condições de crescimento para *Mesorhizobium loti* e *Bradyrhizobium japonicum* em meio líquido, em diferentes condições de pH (5,5 – 7,0) e com três fontes diferentes de carbono (sacarose, dextrose e manitol). O crescimento bacteriano foi avaliado pela medição da densidade óptica (DO) por espectrofotometria. O manitol foi a fonte de carbono mais indicada para o cultivo de *M. loti* e *B. japonicum*, no entanto sacarose e dextrose também podem ser empregadas e o pH do meio contendo manitol não interferiu na taxa de crescimento bacteriano.

Oliveira, Amaral e Burkert (2018) caracterizaram EPS produzidos por *M. loti* SEMIA 816 em meio de cultivo contendo glicerol como fonte de carbono. A produção obtida foi de 4,91 g/L, contendo em sua composição 83% de açúcares totais, 11% de proteínas totais e 6% de cinzas.

Oliveira, Michelin e Burkert (2020) avaliaram o potencial biotecnológico do melaço de soja como fonte de carbono para a produção de SPE a partir de diferentes bactérias diazotróficas. De acordo com os autores, as maiores produções de SPE para todos os micro-organismos estudados foi no meio contendo melaço de soja, quando comparado ao meio tradicional contendo manitol. A produção das SPE foi de 4,47 g/L,

4,12 g/L e 3,76 g/L, respectivamente, para *R. haultense* SEMIA 6450, *E. meliloti* SEMIA 135 e *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816, apresentando resultados promissores na aplicação do melaço de soja para a produção de biopolímeros. Em contrapartida, o meio contendo manitol como fonte de carbono resultou em 3,50 g/L e 1,18 g/L para *E. meliloti* SEMIA 135 e *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816, respectivamente, não havendo a formação de SPE para *R. haultense* SEMIA 6450.

Roesler (2021) avaliaram o efeito das diferentes fontes de carbono (glicose, arabinose e xilose) na produção de EPS de *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816. Segundo os autores, não foram observadas diferenças significativas na produção do EPS frente às diferentes fontes de carbono, sendo a produção de 3,39 g/L, 3,33 g/L e 3,27 g/L para glicose, arabinose e xilose, respectivamente.

Em relação à composição, os EPS produzidos por rizóbios mostram a presença de diferentes monossacarídeos em sua estrutura, como manose, ramnose, glicose, galactose, ácido glicurônico, ácido galacturônico e xilose, contendo ligações do tipo β (1 $\rightarrow$ 3), β (1 $\rightarrow$ 4) e β (1 $\rightarrow$ 6), sendo estes polímeros formados pela condensação de monossacarídeos e unidos quimicamente por ligações glicosídicas (DUTA et al., 2004).

Castellane et al. (2015) investigaram a composição química de EPS produzidos por *R. tropici* SEMIA 4077 e um mutante, utilizando o glicerol como fonte de carbono. Os autores verificaram que os EPS produzidos pelas espécies de rizóbios são heteropolissacarídeos constituídos por mais de um tipo de açúcar, principalmente por galactose e glicose, havendo a presença de outros constituintes (ramnose, ácido glicurônico e ácido galacturônico) em menores proporções.

Segundo Roesler (2021), o EPS produzido por *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 é um heteropolissacarídeo polianiónico, sendo a unidade formada por manose, ramnose, ácido glicurônico, ácido galacturônico, D-glicose e D-galactose. O biopolímero apresentou predominância de glicose em sua composição, com menores quantidades de manose e galactose. Os EPS obtidos a partir de xilose e glicose apresentaram composições semelhantes. No entanto, o EPS produzido com arabinose apresentou uma composição diferente, com teor de ramnose 1,8 vezes superior ao obtido com o cultivo tendo xilose como fonte de carbono. Além disso, o teor de ácido glicurônico do EPS obtido a partir de arabinose foi 1,8 vezes maior quando comparado com a xilose, enquanto apresentou o menor teor de glicose em relação aos outros EPS estudados. Portanto, a fonte de carbono utilizada na cultura bacteriana pode influenciar na sua composição.

Alguns estudos realizados com e sem iluminação avaliaram que a presença de luz azul influencia a simbiose de *R. leguminosarum*, tendo em vista que as proteínas de domínio de luz, oxigênio e voltagem (LOV) encontradas em algumas plantas, algas, fungos e bactérias possuem receptores que detectam a luz azul. Nesta perspectiva, a luz regula a formação de flagelos e a produção de EPS. Bonomi et al. (2012) identificaram que a presença de nódulos em plantas inoculadas com bactérias expostas à iluminação de cor azul foi maior que naquelas cultivadas em ambiente escuro, destacando que a detecção de luz azul por rizóbios pode ser um importante fator na simbiose de *R. leguminosarum*. Neste sentido, a luz azul pode representar um estímulo ambiental para o crescimento de rizóbios e produção de EPS. No estudo de Oliveira (2021), a aplicação do LED azul (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) nas primeiras 24 h de cultivo (fase exponencial) de *E. meliloti* SEMIA 135 em meio à base de melaço de soja resultou em um incremento da produção de SPE de 3,17 g/L em 96 h (cultivo sem iluminação) para 4,79 g/L em 72 h.

3.5 RECUPERAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS

Os EPS são geralmente recuperados do meio de cultivo pelas etapas de centrifugação, filtração, precipitação, diálise e liofilização. Estes biopolímeros são preferencialmente precipitados com solventes orgânicos solúveis em água, que possibilitam a separação pela diminuição da solubilidade do EPS na água, ou seja, desidratando a molécula da SPE. O etanol é o agente precipitante mais comumente utilizado, embora solventes como o isopropanol e cetonas também sejam empregados (BARBOSA et al., 2004). Para recuperação de biopolímeros como a gelana e a xantana, o álcool isopropílico é o mais empregado, sendo o solvente que mais se adequou na precipitação de biopolímeros produzidos por *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666 (NAMPOOTHIRI et al., 2003).

De acordo com Liu et al. (2016), etanol e isopropanol são solventes amplamente utilizados na precipitação de biopolímeros, promovendo associações intramoleculares entre moléculas de biopolímeros pela redução da constante dielétrica do meio. As constantes dielétricas do etanol (20) e isopropanol (25) são muito inferiores às da água (80) a 25 °C. Portanto, a adição de etanol ou isopropanol pode reduzir a constante dielétrica da solução e induzir mudanças conformacionais no polímero, permitindo assim que as moléculas se agreguem e precipitem (LIU et al., 2016). Sendo assim, solventes

orgânicos que apresentam menor constante dielétrica que a da água diminuem a repulsão entre as cargas opostas, favorecendo a maior interação entre as moléculas e a diminuição da solubilidade.

Quando se realiza a recuperação do biopolímero do meio de cultivo, sabe-se que a solução do meio contém majoritariamente água, biopolímero e impurezas, havendo a interação água/biopolímero e biopolímero/biopolímero. Nesse caso, pode-se afirmar que o primeiro tipo de interação prevalecerá sobre o segundo porque a água possui grande capacidade de separação das partículas do soluto, ou seja, constante dielétrica elevada. No entanto, quando se adiciona solventes orgânicos a interação biopolímero/biopolímero prevalece sobre o poder de solvatação da água, precipitando o EPS do meio pela diminuição de sua solubilidade em água (PIERMARIA, 2008).

Azeredo e Oliveira (1996) compararam distintos métodos de precipitação de EPS com um método proposto pelos autores que utilizava 3,5,6-trifenil-2,3,5,6-tetraazabicyclo-1-hexeno (nitron) como agente de precipitação. Desta forma, foram testados diferentes volumes e tipos de solventes - etanol, acetona, propanol, isopropanol e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) - para a precipitação do um EPS bacteriano (*Alcaligenes denitrificans*), sendo que para cada solvente foram realizados dois ensaios de precipitação utilizando proporções 1:1, 1:2 e 1:3 (relação sobrenadante:solvente). Para a precipitação com nitron, os autores utilizaram 0,1 volumes de uma solução de nitron a 10%, pois os autores perceberam que apenas 0,1 volumes de nitron precipitou a máxima quantidade de EPS, sendo uma vantagem a utilização de pequenas quantidades de solvente. A segunda maior precipitação foi oriunda dos três volumes de propanol seguida dos dois volumes de etanol utilizados ao longo do processo.

Hall et al. (2015) avaliaram em seus estudos a produção de EPS produzidos pela bactéria *Escherichia coli* em meio de cultivo contendo diferentes substratos como fonte de carbono (glicose, sacarose e melaço). A recuperação do biopolímero foi realizada em condições de temperatura e agitação controladas e com diferentes solventes e proporções sobrenadante:solvente (acetona 1:2 e isopropanol 1:3). A acetona foi o solvente que apresentou maior rendimento em meio contendo a glicose como fonte de carbono, evidenciando que o tipo de solvente utilizado na precipitação do biopolímero influencia no rendimento da extração.

3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXOPOLISSACARÍDEOS

Estudos recentes têm demonstrado a eficiência das propriedades antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas de EPS de origem microbiana, evidenciando que suas propriedades biológicas contribuem para as mais diversas aplicações tecnológicas (MOHAMED et al., 2018). As atividades fisiológicas das gomas naturais diferem significativamente daquelas dos polímeros sintéticos, sendo mais propensos à biodegradação e menos prejudiciais à saúde, visto que os antioxidantes sintéticos são responsáveis por uma série de danos ao consumidor que ocasionam problemas no fígado e carcinogênese (CASTELLANE et al., 2015).

A adição de antioxidantes naturais contribui tanto para a preservação do alimento como para fornecer benefícios à saúde do consumidor (PAN; MEI, 2010), visto que os radicais livres são extremamente prejudiciais aos seres vivos. Nesta perspectiva, a aplicação de antioxidantes em alimentos se faz necessária a fim de prevenir a ação de espécies reativas, que quando em excesso ocasionam danos às células sadias, contribuindo para o surgimento de doenças como envelhecimento, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos, quando não desencadeia a morte celular (MORETTO et al., 2015).

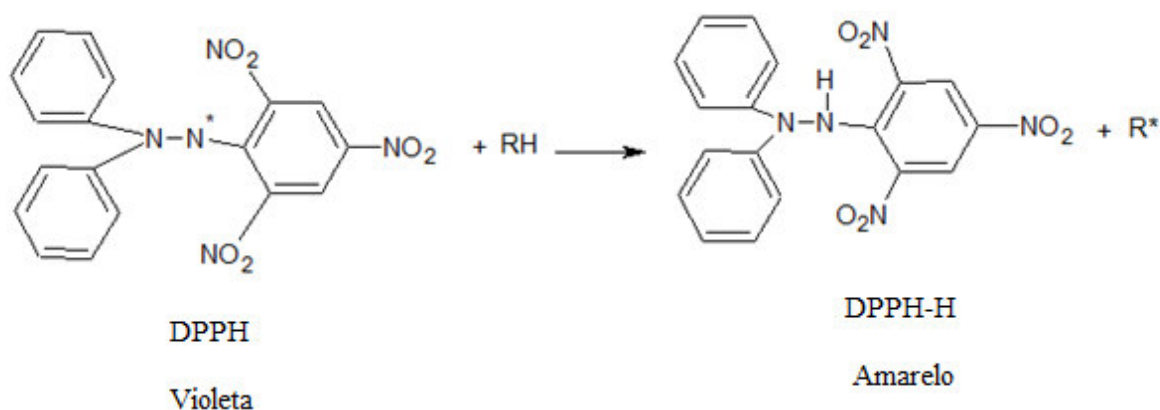
Os polissacarídeos são moléculas que possuem alto grau de hidratação, sendo que seus grupos hidroxilas podem atuar tanto como doadores e aceptores de hidrogênio, agindo no sequestro de radicais pela doação de átomos de hidrogênio. No entanto, algumas características essenciais (massa molar, arranjo estrutural, presença de grupamentos sulfato, carboxílico ou metílico) devem ser levadas em conta a fim de se estabelecer se alguns polissacarídeos possuam maior atividade antioxidante que outros (ANDREW; JAYARAMAN, 2020).

As moléculas de alguns carboidratos possuem a capacidade de doar elétrons devido à presença de grupos redutores, que consistem em um grupo aldeído ou cetona. Grupos funcionais nos EPS podem atuar como aceptores ou doadores de elétrons, sendo considerados sítios ativos para a interação dos radicais livres por intermédio de vários mecanismos. Em função do seu efeito eletrônico, os grupos funcionais permitem que as moléculas orgânicas aumentem sua carga negativa e solubilidade em água por meio da troca de prótons e elétrons (CHEN et al., 2009).

Dentre os EPS microbianos, as β -glicanas merecem destaque por apresentarem uma ampla gama de funções fisiológicas, devido à sua presença no grupo de moléculas fisiologicamente ativas, atuando como modificadores de respostas biológicas que ocasionam propriedades benéficas à saúde humana (THEIS et al., 2017). De acordo com Theis et al. (2017), dentre as principais atividades biológicas das β -glicanas destacam-se a sua aplicação na composição de medicamentos que garantem o tratamento de doenças como o câncer, a AIDS (da sigla em inglês para Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), dislipidemias e diabetes, além de atuarem na absorção de açúcares e nos níveis de lipídios no sangue, modulação do sistema imunológico e atividade antimicrobiana.

Desta forma, a literatura apresenta diversos métodos que avaliam a atividade antioxidante destes compostos, sendo os métodos DPPH[•] e ABTS[•] os mais empregados. O método de DPPH[•] se baseia na captura do radical DPPH[•] (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), na presença de um átomo doador de elétrons de hidrogênio, produzindo um decréscimo da absorbância em 515/517 nm. Neste processo ocorre uma reação de oxirredução, no qual o radical DPPH[•], que possui coloração violeta, é reduzido para DPPH-H (estável), sendo caracterizado por apresentar uma coloração amarela, conforme é descrito na Figura 2 (ALVES et al., 2010).

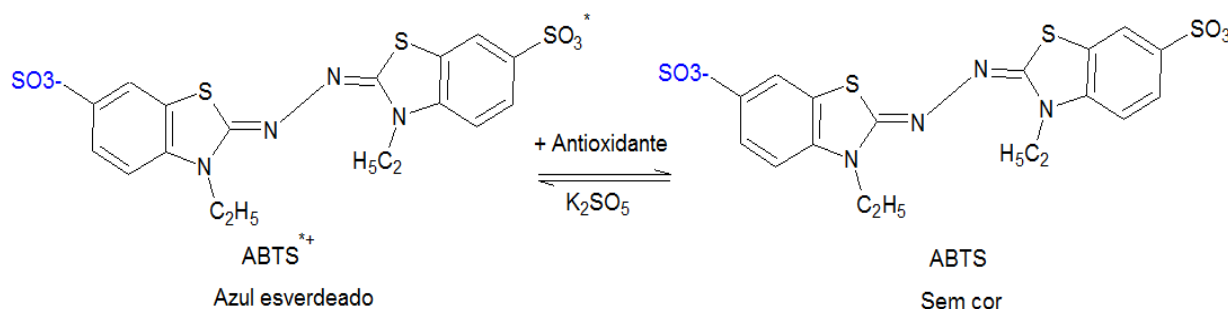
Figura 2 – Reação química do radical DPPH[•] com um antioxidante RH



O método ABTS[•] consiste na avaliação da capacidade dos oxidantes em capturarem o cátion ABTS[•], sendo este um grupo cromóforo produzido a partir de um precursor, o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolína)-6-sulfônico (ABTS[•]), conforme a

Figura 3 (BORGES et al., 2011). O radical ABTS^{•+} é gerado a partir de sua oxidação com o persulfato de potássio, que se reduz na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, ocorrendo a perda da coloração do meio reacional, que pode ser analisada a partir do decréscimo da absorbância. O desaparecimento da coloração e a redução da absorbância são analisados a 734 nm (NIKI, 2010).

Figura 3 – Redução do ABTS^{•+} por um antioxidante



Em um estudo recente, com um EPS produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* GSBA-1, com uma massa molar de 54 kDa contendo glicose como principal monossacarídeo, os autores observaram que o biopolímero apresentava respostas satisfatórias frente à eliminação do radical superóxido e atividade quelante dos íons metálicos, concluindo que a configuração do tipo α , a baixa massa molar e a natureza ácida do EPS influenciaram em sua habilidade antioxidante (ZHAO et al., 2018). Os autores afirmam que os EPS de baixa massa molar pode penetrar mais facilmente nas células do que os EPS de alta massa molar, agindo contra os radicais livres, bem como o aumento de grupos terminais polares.

De acordo com Shang et al. (2018), a predominância dos grupamentos hidroxilas nos polissacarídeos também facilita a atividade antioxidante dos EPS, pois a característica hidrofílica destes compostos aumenta a sua solubilidade em água, que consequentemente facilita o seu contato com os radicais livres, tendo em vista que a presença de grupos capturadores de elétrons em um EPS tende a promover uma reação mais rápida com os radicais livres devido ao aumento da densidade dos elétrons, levando-os à estabilização (XU et al., 2012).

Bomfim et al. (2020) avaliaram a produção de EPS por três linhagens de *Lactobacillus*, verificando que a maior produção foi no meio contendo fruto-

oligossacarídeos (FOS) com a linhagem *L. plantarum* CNPC003. Os EPS eram compostos principalmente por manose e glicose com pequenas quantidades de galactose, evidenciando ser da classe dos heteropolissacarídeos. Posteriormente, os autores avaliaram a capacidade antioxidante por meio dos testes *in vitro* DPPH[•] e ABTS[•], sendo que apresentou atividade de sequestro do radical ABTS[•] de $90,88 \pm 0,80\%$ em uma concentração de 8 mg/L, demonstrando sua possível aplicação como antioxidante natural na indústria alimentícia.

Wang et al. (2017) avaliaram a capacidade antioxidante de um novo EPS produzido pela bactéria *L. plantarum* KX041 pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH[•], ABTS[•], hidroxila e superóxido. No estudo, os autores constataram que moléculas de baixa massa molar e com maior quantidade de grupos hidroxilas influenciaram diretamente na eliminação de DPPH[•], ABTS[•] e na ligação dos EPS aos radicais peróxidos por intermédio da troca de elétrons e átomos de hidrogênio, tendo em vista que apresentam uma maior quantidade de grupos terminais polares. A máxima atividade antioxidante foi de 82% na concentração de 6 mg/mL segundo a metodologia do DPPH[•]. Os autores ainda caracterizaram o EPS, sendo composto principalmente por arabinose, manose, glicose e galactose, com massa molar de 38,67 kDa.

Na Tabela 1 são apresentados vários micro-organismos produtores de EPS que mostraram respostas satisfatórias para atividades antioxidantes.

Tabela 1 – Componentes estruturais de EPS e suas atividades antioxidantes

Micro-organismo	Monossacarídeos e grupos funcionais principais	Métodos de atividade antioxidante aplicados	Percentual de inibição	Referências
<i>L. helveticus</i>	Glicose, manose e galactose.	DPPH [•] , sequestro do radical hidroxila, sequestro do radical superóxido e atividade quelante dos íons metálicos.	37%, 39%, 41% e 43% nas concentrações de 1, 2, 3 e 4 mg/mL (DPPH).	Li et al. (2014)
<i>Pseudomonas</i> sp. RD2SR3	Glicose, manose, galactose, ácido glicurônico, grupos hidroxila e grupos sulfato.	DPPH [•] e enzimas antioxidantes.	39%, 47%, 63% e 82% nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 µg/mL (DPPH).	MAHMOUD et al. (2016)
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> SRFM-1	Glicose e galactose.	DPPH [•] , sequestro da radical hidroxila, sequestro do radical superóxido e atividade quelante dos íons metálicos.	47,52%, 51,12%, 53,31%, 59,94% e 53,31% nas concentrações de 1, 2, 3 e 4 mg/mL (DPPH).	TANG et al. (2017)
<i>B. velezensis</i> MHM3	Glicose, frutose, ramnose e ácido glicurônico.	DPPH [•] , sequestro do radical hidroxila, sequestro do radical superóxido e poder redutor.	50,25%, 62,14%, 74,15%, 82,12% e 85,4% nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL.	MAHGOUB et al. (2018)
<i>Bacillus</i> sp. S-1	Galactose, glicose, manose e grupos hidroxilas.	DPPH [•] , sequestro do radical hidroxila, sequestro do radical superóxido.	50%, 62%, 80% e 88% nas concentrações de 1, 3, 5 e 7 mg/mL.	HU et al. (2019)
<i>L. plantarum</i> CNPC003	Glicose, manose e galactose.	DPPH [•] , ABTS [•] e FRAP.	40,72% e 51,52% nas concentrações de 4 e 8 mg/mL (DPPH); 76,11% e 90,88% nas concentrações de 4 e 8 mg/mL (ABTS).	BOMFIM et al. (2020)

Com isto, estudos que busquem a identificação de novos antioxidantes naturais são necessários, tendo em vista que a população tem buscado cada vez mais adquirir um estilo de vida baseado na inserção de alimentos saudáveis na dieta, fazendo-se essencial o entendimento dos mecanismos antioxidantes dos EPS a fim de compreender sua atuação nos níveis celular e molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais do presente estudo foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Química de Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), bem como em outras unidades da Universidade.

4.1. MATERIAL

4.1.1 Micro-organismos

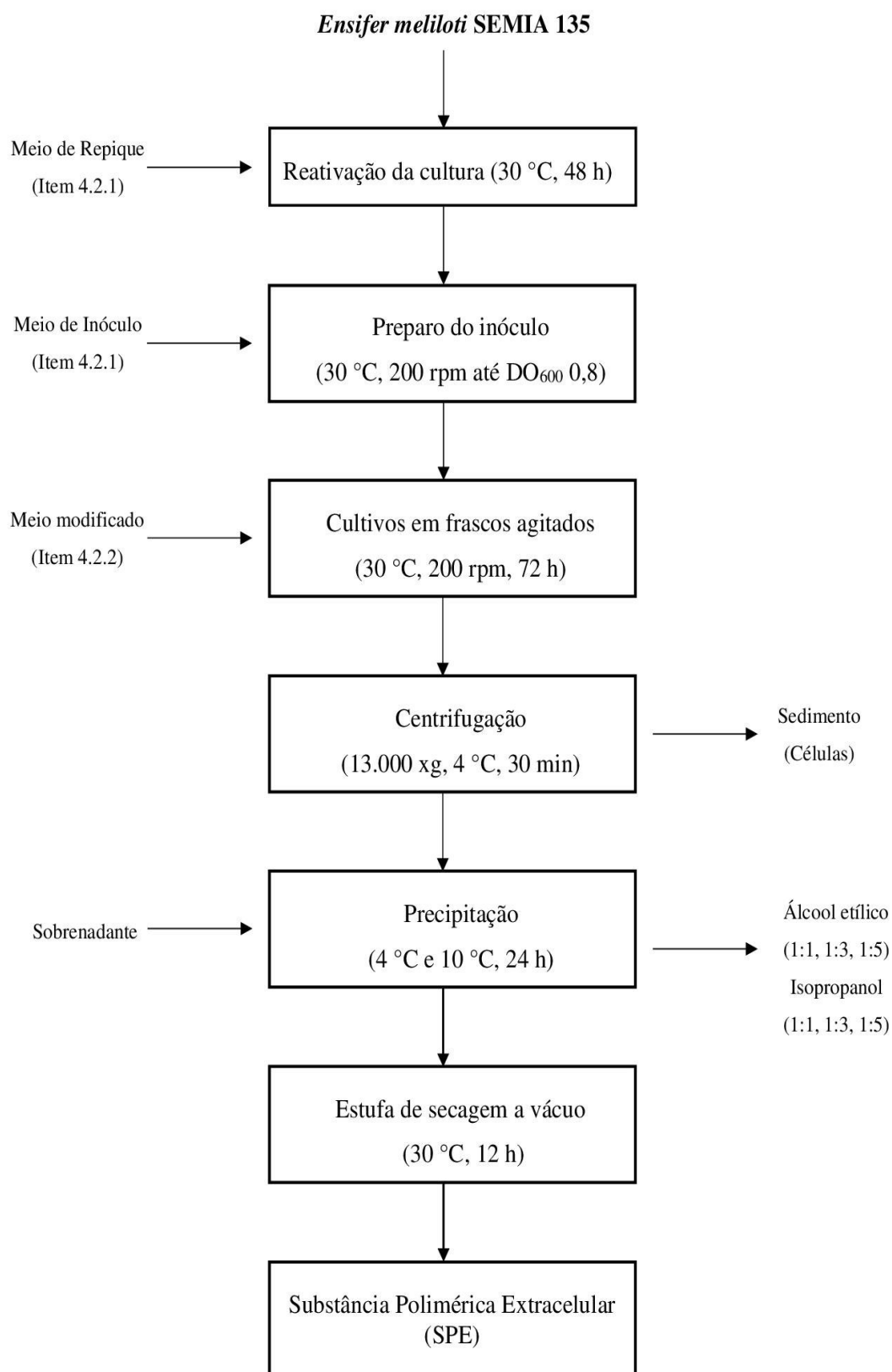
A bactéria *Ensifer meliloti* SEMIA 135 utilizada foi fornecida pelo Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária - DDPA da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação - SEAP (Porto Alegre, RS, Brasil).

4.1.2 Melaço de soja

O melaço de soja disponível no laboratório foi cedido por CJ Selecta (Araguari, MG, Brasil). O melaço de soja foi mantido armazenado sob refrigeração e foi previamente caracterizado (carboidratos 65%, lipídios 13%, proteínas 8% e cinzas 14%), de acordo com Oliveira, Michelin e Burkert (2020).

4.2 MÉTODOS

O fluxograma abaixo apresenta as etapas de obtenção das SPE, desde a manutenção da cultura microbiana até a secagem do bioproduto.

Figura 4 – Fluxograma das etapas executadas na produção das SPE

4.2.1 Manutenção da cultura bacteriana

A partir da cultura mantida refrigerada a 8 °C, foram realizados repiques sucessivos, sendo utilizado o meio YMA (*Yeast Manitol*), com a seguinte composição (g/L): 10 manitol; 0,5 K₂HPO₄; 0,2 MgSO₄·7H₂O; 0,1 NaCl; 0,4 extrato de levedura; 15 ágar. A bactéria foi incubada em estufa bacteriológica (Quimis QE316M2, Brasil) a 30 °C por 48 h. A linhagem foi mantida refrigerada (8°C), sendo realizados repiques trimestrais.

4.2.2 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o método descrito por Staudt, Wolfe e Shrout (2012). Um tubo contendo a cultura microbiana reativada em ágar YMA (30 °C por 48 h) foi raspado com 10 mL de água peptonada 0,1% (m/v) a fim de resultar em uma suspensão de células. Posteriormente, a suspensão foi transferida para um frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de caldo YMA com a seguinte composição (g/L): 10 manitol; 0,1 K₂HPO₄; 0,4 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄·7H₂O; 0,1 NaCl; 0,4 extrato de levedura. Por fim, o frasco foi disposto em uma incubadora com agitação orbital (Tecnal TE - 420, Brasil) a 30 °C e 200 rpm até atingir uma densidade ótica (DO) de 0,8 a 600 nm.

4.2.3 Cultivos em frascos agitados

Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL do meio com a seguinte composição (g/L): 10 melaço de soja; 0,1 K₂HPO₄; 0,4 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄·7H₂O; 0,1 NaCl; 0,4 extrato de levedura; 0,12 MnCl₂·7H₂O; 0,15 CaCl₂·2H₂O; pH ajustado em 7,0. Os frascos foram dispostos em incubadora com agitação orbital a 30 °C, 200 rpm por 96 h, com a adição de 10% (v/v) de inóculo (OLIVEIRA; MICHELON; BURKERT, 2020).

Os cultivos foram conduzidos sem e com iluminação. No caso dos cultivos com iluminação, utilizou-se lâmpadas de diodos emissores de luz (LED) de cor azul, a uma distância de aproximadamente 50 cm dos frascos *Erlenmeyer*, durante as primeiras 24 h de cultivo (intensidade de 50 µmol/m²s), seguido por um período de 72 h sem incidência

de qualquer tipo de iluminação (OLIVEIRA, 2021). O cultivo controle foi realizado sem a incidência de qualquer tipo de iluminação.

4.2.4 Recuperação das SPE

A recuperação das SPE obtidas no final do cultivo foi realizada por centrifugação (Eppendorf 5804-R, Alemanha) a 13.000 x g por 30 min a 4 °C a fim de separar a biomassa microbiana do sobrenadante, segundo Ribeiro (2015) com modificações. Posteriormente, foi realizado o estudo da precipitação das SPE a partir do sobrenadante livre de células pela adição de solventes orgânicos distintos em diferentes proporções sobrenadante:solvente (v:v): etanol 96 °GL (1:1, 1:3 e 1:5) e isopropanol (1:1, 1:3 e 1:5) em banho termostatzado sob temperatura de refrigeração (10 °C) ou temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, as amostras ficaram em repouso por 24 h na respectiva temperatura. Por fim, a concentração da SPE foi determinada por gravimetria, sendo o precipitado recuperado e seco em estufa a vácuo a 30 °C até massa constante. Os ensaios foram realizados em triplicata. O percentual de recuperação de SPE foi expresso conforme a Equação 1.

$$\text{Rec (\%)} = \left(\frac{m_{\text{prec}}}{m_{\text{ref}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Sendo Rec (%), o percentual de recuperação de SPE; m_{prec} , a massa de SPE recuperada na condição testada de precipitação; e m_{ref} é a massa média recuperada na condição de referência de precipitação (etanol 1:3 a 10 °C).

4.2.5 Caracterização Parcial das Substâncias Poliméricas Extracelulares

A caracterização das SPE produzidas por *E. meliloti* SEMIA 135 foi realizada na amostra obtida com o cultivo controle (sem iluminação) e na amostra obtida com o cultivo com iluminação na cor azul, sendo utilizado o método de precipitação estabelecido na etapa anterior. Nestas amostras, foram avaliadas a composição elementar (CHN), a

presença de grupos funcionais por espectroscopia de infravermelho e a atividade antioxidante.

4.2.5.1 Análise elementar de carbono, nitrogênio e hidrogênio

As amostras de SPE foram analisadas em analisador elementar (Perkin Elmer 2400 series II, EUA), através da combustão das amostras em atmosfera de oxigênio puro, sendo os gases de saída quantificados em detector TCD (detector de condutividade térmica).

4.2.5.2 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

Os grupos funcionais presentes nas SPE foram identificados por um espectrofotômetro de infravermelho (Shimadzu IR Prestige-21, Japão). As amostras foram analisadas sob a forma de pastilhas de KBr (200 mg de KBr e 2 mg de SPE). Os espectros foram obtidos com 70 *scans* e resolução de 2,0 cm^{-1} na faixa de 145-4000 cm^{-1} .

4.2.6 Atividade antioxidante

Na determinação da atividade antioxidante pelos diferentes métodos propostos, as amostras de SPE analisadas foram preparadas de acordo com as normas recomendadas, sendo previamente rotuladas e acondicionadas em frascos âmbar na ausência de luz.

4.2.6.1 Sequestro do radical DPPH[•]

Para a determinação da atividade antioxidante utilizou-se o método DPPH[•], descrito por Yang, Zheng e Cao (2009), sendo inicialmente adicionados 5 mL da solução etanólica de DPPH[•] (120 $\mu\text{g/L}$) em um tubo de ensaio contendo 1 mL da SPE de *E. meliloti* SEMIA 135 em diferentes concentrações de SPE (1, 2, 3 e 4 mg/mL). A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro a 517 nm e expressa a porcentagem de sequestro do radical DPPH[•], com base na Equação 2. Foram testados os tempos 0, 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 min até a estabilização da leitura, sendo o

tempo de 90 min escolhido para a análise estatística dos dados. Os experimentos foram feitos em triplicata.

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{sistema}} - A_{\text{mistura reacional}}}{A_{\text{sistema}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

A_{sistema} é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH[•] na ausência da amostra;

$A_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância da mistura reacional contendo o radical DPPH[•] e as SPE de *E. meliloti* SEMIA 135.

4.2.6.2 Sequestro do radical ABTS[•]

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do radical ABTS[•], segundo o método descrito por Re et al. (1999). Em um tubo de ensaio foram adicionados 5 mL de uma solução 7 mM de ABTS[•] e 88 µL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio (K₂S₂O₈). A mistura permaneceu em repouso, em temperatura ambiente e sem a presença de luz durante 16 h, a fim de gerar o radical cromóforo ABTS[•]. Posteriormente, 1 mL desta mistura foi diluído em etanol até se obter uma solução com absorbância de $1,00 \pm 0,05$, a 734 nm. Em um ambiente escuro foram transferidas várias concentrações de suspensão das SPE de *E. meliloti* SEMIA 135 (1, 2, 3 e 4 mg/mL) em tubos de ensaio contendo 50 µL do radical ABTS[•]. Por fim, a leitura da absorbância foi determinada após 6 min de reação em espectrofotômetro a 734 nm, utilizando a Equação 3 para o cálculo da atividade antioxidante, expressa como porcentagem de sequestro do radical ABTS[•]. As leituras foram feitas até 6 min, sendo os dados obtidos neste tempo utilizados para a análise estatística. Os experimentos foram realizados em triplicata.

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{sistema}} - A_{\text{mistura reacional}}}{A_{\text{sistema}}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

A_{sistema} é a absorbância inicial da solução etanólica de ABTS[•] na ausência da amostra;

$A_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância da mistura reacional contendo o radical ABTS[•] e as SPE de *E. meliloti* SEMIA 135.

4.3.6.3 Poder redutor

A atividade antioxidante foi avaliada a partir do método do poder redutor descrito por Yen e Chen (1995), baseado na redução do ferricianeto (Fe^{3+}) a ferrocianeto (Fe^{2+}). Aliquotas de 1 mL da amostra em diferentes concentrações de SPE (1, 2, 3 e 4 mg/mL) foram misturadas a 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 1% (m/v). Posteriormente, a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e logo após resfriamento foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v), com posterior agitação. Na sequência, alíquotas de 2,5 mL da mistura foram transferidas para um tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl_3 a 0,1% (m/v). Por fim, a leitura da absorbância foi realizada a 700 nm. Os experimentos foram feitos em triplicata. O resultado obtido foi expresso como percentual de poder redutor em relação ao determinado para o ácido ascórbico.

4.2.7 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$), utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para verificar diferenças significativas a um nível de confiança de 95 % ($p \leq 0,05$). Para avaliar a significância estatística entre dois tratamentos, foi aplicado o teste t ($p \leq 0,05$). O *software* utilizado para as análises estatísticas foi R 3.4.4 (*R Foundation for Statistical Computing*, Áustria).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DA PRECIPITAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES

As SPE obtidas no cultivo controle (sem iluminação) de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 foram recuperadas do meio após incubação de 72 h. As Figuras 5 e 6 mostram, respectivamente, o caldo transferido para tubos *Falcon* para posterior centrifugação e as SPE recuperadas por precipitação para posterior secagem.

Figura 5 – Cultivo submerso do *E. meliloti* SEMIA 135 (A); tubos *Falcon* contendo as amostras para centrifugação (B).

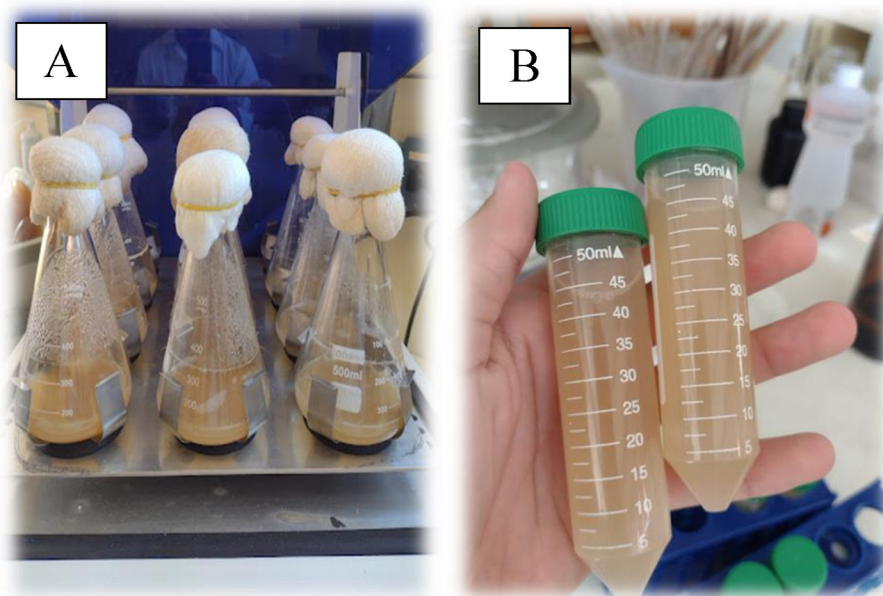
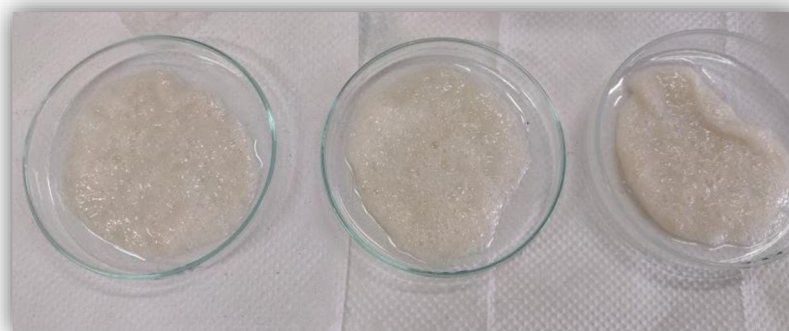


Figura 6 – Placas de Petri contendo as SPE precipitadas do sobrenadante.



Na Tabela 2 são apresentados os rendimentos obtidos na recuperação das SPE (%) de *E. meliloti* SEMIA 135 utilizando o solvente etanol, para diferentes proporções sobrenadante:solvente e temperaturas.

Tabela 2 – Recuperação de SPE (%)* produzidas no cultivo controle utilizando etanol como solvente em diferentes condições

Proporção sobrenadante:solvente	10 °C	25 °C
1:5	127,73±14,35 ^{a,A}	108,57±5,78 ^{a,A}
1:3	100,00±2,00 ^{b,B}	109,91±5,31 ^{a,A}
1:1	7,92±0,14 ^{c,B}	33,57±3,18 ^{b,A}

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras maiúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa entre temperaturas a 95% de confiança (Teste t); letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa entre proporções de sobrenadante:solvente a 95% de confiança (teste Tukey).

* 100% de recuperação corresponde ao método de precipitação de referência (etanol 1:3 a 10 °C).

De acordo com a Tabela 2, pode-se perceber que as SPE recuperadas na proporção 1:5 não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre as duas temperaturas estudadas, sendo 127,73% e 108,57% para as temperaturas 10 °C e 25 °C, respectivamente. Por outro lado, para a proporção 1:3 houve um aumento significativo ($p<0,05$) na recuperação a 25°C (109,21%) quando comparado à condição controle a 10 °C. Na proporção 1:1 observou-se também que houve diferença significativa ($p<0,05$), sendo os valores de recuperação significativamente menores quando comparados às demais condições testadas, indicando não ser possível reduzir o volume de solvente para reduzir custos. Por outro lado, nas proporções de 1:3 e 1:5, foi possível atingir uma recuperação de EPS igual ou superior utilizando uma temperatura superior, próxima à temperatura ambiente, evitando gastos com sistemas de refrigeração.

Quando é avaliada a recuperação de SPE na temperatura de 10 °C, observa-se que as diferentes proporções de sobrenadante:solvente testadas diferiram significativamente entre si ($p<0,05$), com os melhores resultados para a proporção de 1:5, ou seja, indicando que um aumento do volume de solvente aumentou a recuperação das SPE. Por outro lado, para a temperatura de 25 °C, as proporções 1:5 e 1:3 não diferiram significativamente ($p>0,05$), mas estas foram significativamente diferentes da proporção 1:1 ($p<0,05$).

A Tabela 3 apresenta os dados relativos à recuperação de SPE utilizando isopropanol como solvente, em diferentes proporções sobrenadante:solvente e temperatura.

Tabela 3 – Recuperação de SPE (%)* produzidas no cultivo controle utilizando isopropanol como solvente

Proporção sobrenadante:solvente	10 °C	25 °C
1:5	92,92±1,44 ^{a,B}	122,06±0,85 ^{a,A}
1:3	95,48±0,81 ^{a,B}	126,23±10,37 ^{a,A}
1:1	24,45±2,23 ^{b,B}	32,83±0,73 ^{b,A}

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras maiúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa entre temperaturas a 95% de confiança (Teste t); letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa entre proporções de sobrenadante:solvente a 95% de confiança (Teste Tukey).

* 100% de recuperação corresponde ao método de precipitação de referência (etanol 1:3 a 10°C).

De acordo com a Tabela 3, na proporção de 1:5 houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as temperaturas de 10 °C e 25 °C, sendo este mesmo comportamento observado nas proporções 1:3 e 1:1, indicando que a temperatura de 25 °C resultou em maior recuperação das SPE, o que pode ser uma vantagem operacional, conciliando um aumento da recuperação com menor gasto energético. O resultado é similar ao observado quando se utilizou etanol (Tabela 2). Em relação à recuperação das SPE a 10 °C, observou-se que as proporções de 1:5 e 1:3 não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), havendo uma recuperação de 92,92% e 95,48%, respectivamente, ou seja, não houve impacto na recuperação com o aumento do volume de solvente. Por outro lado, houve diferença significativa ($p < 0,05$) a 10 °C na proporção 1:1, indicando que essa redução no volume de solvente afeta negativamente a recuperação, fato também observado quando o etanol foi usado como solvente. Na temperatura de 25 °C, não houve diferença significativa entre as proporções 1:5 e 1:3 ($p > 0,05$), porém estas diferiram significativamente ($p < 0,05$) da proporção 1:1, mesmo comportamento observado na temperatura de 10 °C.

Liu et al (2016) avaliaram a utilização de diferentes solventes na recuperação de EPS oriundos das sementes de *Gleditsia sinensis* e *Gleditsia microphylla*, difundidas na China. Segundo os autores, a recuperação da goma de *G. sinensis* (GSG) e *G. microphylla* (GMG) em etanol foi de 81,7% e 82,5%, respectivamente, enquanto em isopropanol foi de 81,3% e 82,9%. Conforme o estudo de precipitação da goma, a quantidade de isopropanol deve ser menor que a do etanol devido à menor constante dielétrica do isopropanol, resultando em um precipitado mais compacto do que o encontrado no etanol.

(20 vs. 25 para o etanol). A constante dielétrica de um solvente está intimamente relacionada à sua capacidade de aumentar as forças atrativas entre as moléculas do soluto que eventualmente provocam a precipitação (GONZALES et al., 1990).

Analisando as Tabelas 2 e 3, observa-se que alguns ensaios se destacaram em termos de recuperação de SPE em relação ao método de precipitação de referência, resultando em incremento na recuperação (valores superiores a 100%). Desta forma, estes foram selecionados para fins de comparação, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Recuperação de SPE (%)* produzidas no cultivo controle utilizando isopropanol ou etanol como solvente

Solvente	Proporção sobrenadante:solvente	Temperatura (°C)	Recuperação (%)
Etanol	1:5	10	127,73±14,35 ^a
Etanol	1:5	25	108,57±5,78 ^{a,b}
Etanol	1:3	10	100,00±2,00 ^b
Etanol	1:3	25	109,91±5,31 ^{a,b}
Isopropanol	1:5	25	122,06±0,85 ^a
Isopropanol	1:3	25	126,23±10,37 ^a

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa entre os ensaios a 95% de confiança (teste Tukey).

* 100% de recuperação corresponde ao método de precipitação de referência (etanol 1:3 a 10 °C).

Na Tabela 4, é importante notar que todas as condições testadas diferentes da condição de referência (etanol 1:3 a 10 °C), não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$). Desta forma, as condições selecionadas para serem testadas na recuperação de SPE obtidas no cultivo com LED na cor azul foram etanol e isopropanol na proporção de 1:3 (sobrenadante:solvente) a 25 °C, considerando que a redução da temperatura e o aumento do volume de solvente adicionado não incrementaram a recuperação, condições estas que também representam um menor custo por não ser necessária a refrigeração e um volume adicional de solvente. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos na recuperação de SPE obtidas no cultivo com LED azul.

Tabela 5 – Recuperação de SPE (%)* produzidas em cultivo com iluminação (LED azul) a 25°C na proporção sobrenadante:solvente: 1:3

Solvente	Recuperação (%)
Etanol	163,50±0,80 ^B
Isopropanol	170±0,64 ^A

Temperatura: 25 °C; proporção sobrenadante:solvente: 1:3.

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa entre os solventes a 95% de confiança (teste t).

* 100% de recuperação corresponde ao método de precipitação de referência (etanol 1:3 sob refrigeração) no cultivo controle.

De acordo com a Tabela 5, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os solventes na recuperação das SPE obtidas no cultivo com LED, mantendo a mesma temperatura (25 °C) e proporção sobrenadante solvente (1:3). O solvente isopropanol foi o que resultou em uma maior recuperação frente ao controle (etanol 1:3 sob refrigeração). No entanto, por questões econômicas o etanol é mais viável, considerando que o incremento com a mudança de solvente não foi muito elevado. Desta forma, adotou-se na continuidade do estudo, a recuperação das SPE utilizando a precipitação por adição de etanol na proporção sobrenadante:solvente de 1:3 e temperatura de 25 °C.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES

5.2.1 Análise de CHN

A Tabela 6 mostra a composição elementar, em termos de teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio, das amostras de SPE recuperadas nas condições estabelecidas na etapa anterior, tanto para o cultivo sem iluminação quanto para o cultivo com iluminação (LED azul nas primeiras 24 h de cultivo).

Tabela 6 - Teores de C, N e H nas amostras de SPE produzidas em diferentes condições de cultivo

Cultivo	C (% m/m)	N (% m/m)	H (% m/m)
Sem iluminação	24,77±0,11 ^a	0,80±0,01 ^a	4,10±0,04 ^b
Com iluminação*	24,25±0,18 ^b	0,64±0,03 ^b	4,52±0,01 ^a

Valores médios (n=2).

* Iluminação com LED azul nas primeiras 24 h de cultivo (intensidade de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$).

Observa-se na Tabela 6 que as variações observadas foram pequenas comparando-se os dois modos de cultivo, mas houve diferença significativa frente aos teores de C, N e H ($p < 0,05$). A composição em nitrogênio pode estar relacionada à presença de proteínas, pois também podem ser precipitadas por solventes orgânicos. A presença de grupos característicos de proteínas pode ser observada na análise de espectroscopia no infravermelho, em que se observou picos em cerca de 3365 cm^{-1} e formatos de banda característicos de proteínas (OSIRO; FRANCO; COLNAGO, 2011).

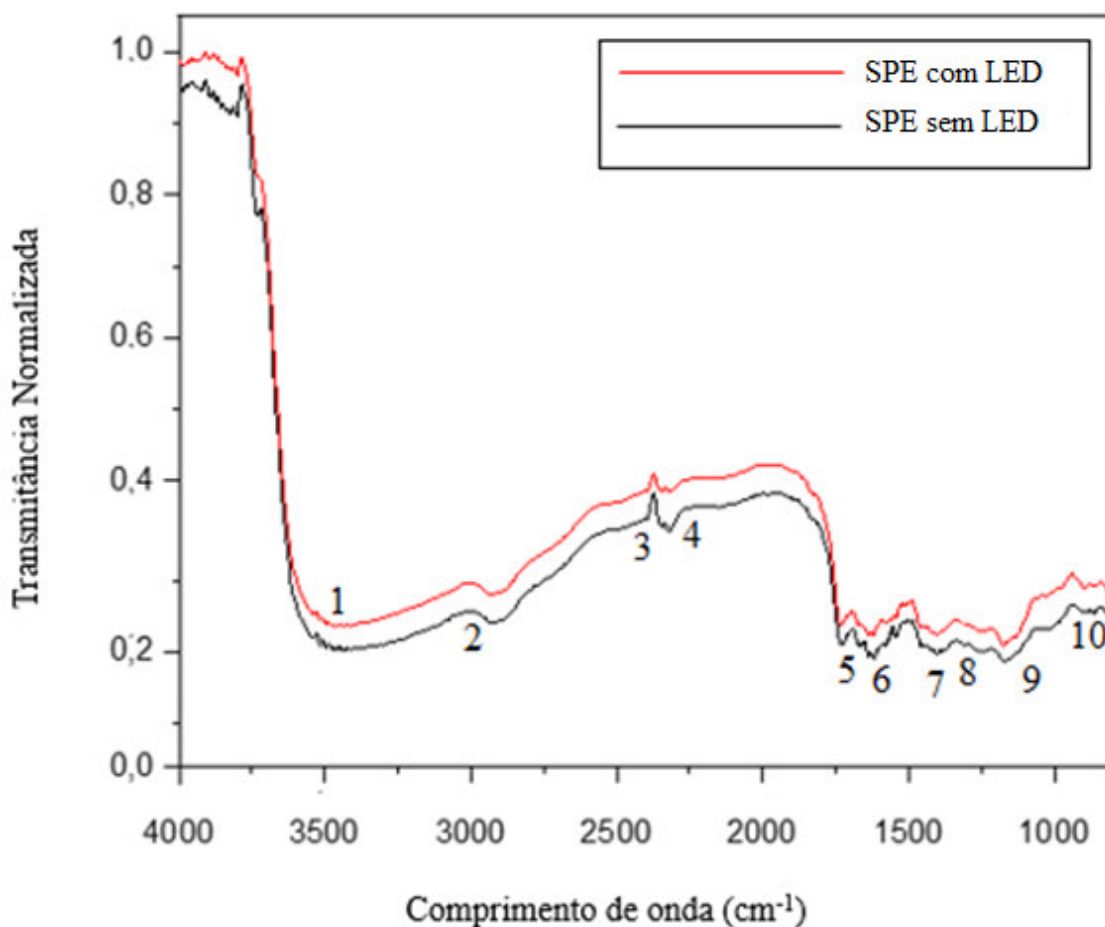
Santos (2022) obtiveram uma composição de C, N e H de 37,36%, 1,81% e 6,81%, respectivamente, para um EPS produzido com melaço de soja (30 g/L) como fonte de carbono em biorreator de bancada. Estes resultados mostraram teores superiores ao encontrado no presente estudo, uma vez que as condições de produção e recuperação do SPE foram distintas.

Silva (2020) avaliou a composição de CHN de celulose bacteriana produzida a partir do melaço da cana-de-açúcar, sintetizada pela bactéria *Zoogloea* sp. A análise elementar foi realizada em duplicata (S1 e S2) e indicou que este biomaterial possui carbono (S1 42,94%; S2 43,43%), hidrogênio (S1 6,73%; S2 6,76%) e nitrogênio (S1 0,28%; S2 0,23%).

5.2.2 Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)

Os espectros de absorção do FTIR-ATR das amostras de SPE produzidas no cultivo sem iluminação e para a amostra cultivada sob a influência de luz azul são apresentados na Figura 7. Pela análise dos espectros é possível verificar a similaridade entre ambas SPE produzidas, sendo observada a presença de grupos funcionais característicos de EPS de rizóbios nas duas amostras.

Figura 7 – Espectro de absorção no infravermelho para as amostras de SPE obtidas nos cultivos sem e com iluminação



Conforme a Figura 7, as bandas detectadas entre 3417-3422 cm^{-1} (1) estão associadas a grupos hidroxila (OH) e a absorção de água, apresentando uma banda alongada, ampla e intensa (ANDHARE et al., 2017; CARRIÓN; DELGADO; MERCADE, 2015; OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018).

O pico em 3365 cm^{-1} (1) e o formato da banda em 3390 cm^{-1} , com a presença de dois picos finos nesta região, indica a sobreposição dos alongamentos de O-H e N-H, onde a última pode ser referente à possível presença de proteínas (OSIRO; FRANCO; COLNAGO, 2011).

A banda 2 apresentada perto de 2925 cm^{-1} pode estar relacionada a vibrações de estiramento C-H dos grupos CH_2 e CH_3 (ANDHARE et al., 2017; CARRIÓN; DELGADO; MERCADE, 2015). A faixa de absorção entre 2500 e 2000 cm^{-1} (banda 3) está relacionada as ligações C-H (ROESLER., 2021).

Já a vibração reportada perto de 1735 cm^{-1} (4) pode estar relacionada à vibração de estiramento C=O de ésteres relacionados a grupos acetil (ANDHARE et al., 2017), piruvato ou acetato (CASTELLANE et al., 2015). A banda em 1650 cm^{-1} (5) corresponde à presença de ácidos carboxílicos (CASTELLANE et al., 2015; ROESLER, 2021).

O pico de adsorção entre $1420\text{-}1653\text{ cm}^{-1}$ (6) é característico de estiramentos de carboxilatos ($-\text{COO}^-$) presentes em resíduos ácidos como succinato e acetato (ANDHARE et al., 2017; CASTELLANE et al., 2017; OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018). O pico em 1350 cm^{-1} (7) está ligado à presença de íons carboxilato. Sinais entre $1251\text{-}1255\text{ cm}^{-1}$ (8) podem corresponder a grupos acetil (PRIYANKA et al., 2015).

Os picos detectados entre $1035\text{-}1153\text{ cm}^{-1}$ (9) podem estar associados à presença de vibrações de estiramento C–O a grupos $\text{CH}_3\text{-C=O}$, bem como C–O e C–C de carboidratos (ANDHARE et al., 2017; CARRIÓN; DELGADO; MERCADE, 2015), assim como indicam a presença de ácidos urônicos (DEEPIKA et al., 2016).

Os espectros de FT-IR para ambas as amostras demonstram numerosas bandas dentro das faixas de $4000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$. O espectro das SPE produzidas pela bactéria *E. meliloti* SEMIA 135 apresenta picos nas regiões de $897\text{-}931\text{ cm}^{-1}$, indicando a predominância de configurações do tipo β nas ligações glicosídicas (10) (OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018; PRIYANKA et al., 2015).

5.2.3 Atividade antioxidante

5.2.3.1 Sequestro do radical DPPH $^{\bullet}$

O sequestro do radical DPPH $^{\bullet}$ é um método colorimétrico que se baseia na mudança da coloração roxa do radical oxidante para cor amarela, quando a substância avaliada reduz a capacidade oxidante do radical. A mudança da coloração é devida ao fato do radical DPPH $^{\bullet}$ possuir um único elétron que absorve a 515 nm , ou seja, quando este elétron se torna pareado na presença de moléculas sequestradoras de radicais livres, a coloração desaparece, sendo esta descoloração resultado da quantidade de elétrons pareado na reação (CHOI et al., 2002).

A Figura 8 mostra no tubo à esquerda a coloração roxa do radical DPPH $^{\bullet}$ com o seu elétron desemparelhado, seguido dos demais tubos ao qual a reação já havia acontecido na presença das suspensões testadas contendo SPE de *E. meliloti* SEMIA 135.

Figura 8 – Imagem ilustrativa referente ao ensaio de atividade antioxidante das suspensões de SPE de *E. meliloti* SEMIA 135 baseada no sequestro do radical DPPH[•]



(A)Tubo a esquerda apresenta coloração roxa do radical DPPH[•] com o seu elétron desemparelhado; demais tubos (B, C e D) apresentam a coloração obtida com suspensões de SPE de *E. meliloti* SEMIA 135.

A Tabela 7 apresenta os dados obtidos na avaliação da atividade antioxidante das suspensões de SPE frente ao radical DPPH[•]. De acordo com os resultados, os valores de atividade antioxidante foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre todas as concentrações testadas, tanto no cultivo sem LED quanto no cultivo com LED, indicando que o aumento da concentração de SPE incrementa a atividade antioxidante, comportamento este observado por diversos autores que estudaram EPS microbianos (TRABELSI et al., 2017; NEHALA et al., 2019; BOMFIM et al., 2020). No entanto, este comportamento não foi observado para o ácido ascórbico usado como padrão, não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações estudadas.

Por outro lado, ao comparar-se as SPE obtidas em diferentes modos de cultivo, em todas as concentrações testadas houve diferenças significativas ($p < 0,05$), com as SPE obtidas no cultivo com LED apresentando maiores valores de atividade antioxidante em relação ao cultivo sem iluminação. Além disso, ambas SPE diferiram significativamente ($p < 0,05$) do ácido ascórbico, apresentando valores inferiores. Entretanto, na concentração de 4 mg/mL, as diferenças caíram para 6,29% (com LED) e 6,14% (sem LED) em

comparação ao ácido ascórbico, indicando a potencialidade do uso das SPE como biomoléculas com atividade antioxidante, com valores de, respectivamente, 80,32% e 80,47%.

Tabela 7 – Atividade antioxidante (%) das suspensões de SPE de *E. meliloti* SEMIA 135 pelo método do sequestro do radical DPPH^{*}

Concentração	Atividade Antioxidante (%)		Padrão ácido ascórbico
	Cultivo sem LED	Cultivo com LED	
1 mg/mL	56,82 ^{dC} ±0,12	65,79 ^{dB} ±0,01	86,69 ^{aA} ±0,00
2 mg/mL	63,32 ^{cC} ±0,09	68,92 ^{cB} ±0,02	86,29 ^{bA} ±0,01
3 mg/mL	74,18 ^{bC} ±0,02	76,36 ^{bB} ±0,00	86,29 ^{aA} ±0,00
4 mg/mL	80,47 ^{aB} ±0,02	80,32 ^{aB} ±0,03	86,61 ^{aA} ±0,01

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa nas atividades antioxidantes em diferentes concentrações de SPE a 95% de confiança (teste Tukey); letras maiúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa entre as suspensões e o padrão ácido ascórbico a 95% de confiança (teste Tukey).

Segundo a literatura, a atividade antioxidante de polissacarídeos pode-se dar devida à presença de grupos hidroxilas e grupos funcionais, que podem doar elétrons reduzindo os radicais livres a uma forma mais estável (MOHAMED et al., 2018). A ação antioxidante de polissacarídeos pode também estar relacionada à massa molar, teor de sulfato e posição de grupos sulfatos e resíduos de glicoproteínas de polissacarídeos (WANG et al., 2018).

A alta atividade antioxidante observada no presente estudo também pode estar relacionada à presença de ácidos urônicos conforme indicado pela FTIR-ATR. Segundo Xu et al. (2012), a presença de ácidos urônicos contribui com a elevação de cargas negativas no polissacarídeo, bem como na efetivação da ação sequestrante de radicais livres pela ativação de átomos de hidrogênio, sendo um importante indicador da atividade antioxidante de EPS. Supõe-se que a presença de grupos eletrofílicos como ceto ou aldeído em polissacarídeos ácidos facilita a liberação de hidrogênio da ligação OH. Grupos acetil e hidroxilas também influenciam a atividade antioxidante de EPS, atuando na eliminação do radical DPPH^{*} através da ativação do hidrogênio do carbono anomérico do açúcar.

Outro fator que influencia a atividade antioxidante dos biopolímeros de origem natural é a presença de polissacarídeos conjugados, visto que possuem em sua composição outros componentes, como aminoácidos, proteínas, lipídios e resíduos de ácidos nucleicos (CHEN et al., 2008). Vários estudos evidenciaram que a proteína ou fração peptídica no polissacarídeo é responsável por parte do efeito de eliminação de radicais (CHEN et al., 2008).

Estudos demonstram que os extratos brutos de exopolissacarídeos exibiram atividade antioxidante superior frente aos exopolissacarídeos purificados, que demonstram atividade antioxidante baixa ou moderada (WU et al., 2014). Sendo assim, substâncias antioxidantes contidas no extrato bruto de polissacarídeo, como pigmentos, flavonas, peptídeos, proteínas e polifenóis, podem contribuir para a atividade antioxidante.

Wei et al. (2010) purificaram um polissacarídeo ácido de *Prunella vulgaris* Linn., cuja capacidade de eliminação contra DPPH e radical hidroxila foi significativamente menor do que o polissacarídeo bruto, possivelmente atribuído a outros antioxidantes, como flavonas e pigmentos contidos nos extratos brutos de polissacarídeos.

Maalej et al. (2014) relataram que o EPS produzido por *Pseudomonas stutzeri* AS22 465 demonstrou atividade antioxidante *in vitro*, pois segundo os autores a ação sequestrante do radical DPPH[•] é devido à presença de glicose e manose como componentes do EPS. Santos (2022) avaliou em seus estudos a atividade antioxidante de EPS produzidos a partir de *Enterococcus* sp. isolado de queijo coalho artesanal, nas concentrações de 0,2 mg/mL e 2 mg/mL. O EPS utilizado apresentou 16% de atividade antioxidante na concentração mínima e 27% na concentração máxima. O padrão ácido ascórbico exibiu atividade antioxidante acima de 85% nas concentrações estudadas (0,2 e 2 mg/mL), resultado semelhante ao obtido no presente estudo frente ao padrão (ácido ascórbico), que foi de 89,14% (2 mg/mL).

Trabelsi et al. (2017) avaliaram a atividade antioxidante de um EPS obtido a partir de uma cepa de *Lactobacillus* sp. Segundo os autores, o EPS obtido apresentou atividade antioxidante a partir da aplicação de quatro diferentes métodos: sequestro de DPPH[•], poder redutor, branqueamento do β -caroteno e atividade de quelação de metais. Para o ensaio do DPPH[•] a capacidade antioxidante do EPS variou de 14% para uma concentração de 500 μ g/mL, havendo um aumento para 95,76% a uma concentração de 10 mg/mL, sendo o resultado dependente da concentração da amostra. Nehala et al. (2019), ao avaliarem a atividade antioxidante de um EPS produzido por *Lactococcus*

lactis F-mou LT898177.1, constataram que todas as concentrações testadas apresentaram atividade antioxidante. As atividades antioxidantes foram de 83%, 88%, 93% e 98% para as respectivas concentrações 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL e 4 mg/mL. Bomfim et al. (2020) realizaram em seus estudos a avaliação da atividade antioxidante de EPS produzidos por *L. plantarum* CNPC003. Para os autores, a capacidade de eliminação dos radicais DPPH[•] e ABTS[•] aumentou com o incremento da concentração do EPS na faixa de 0 a 8 mg/mL.

5.2.3.2 Sequestro do radical ABTS[•]

A determinação da capacidade sequestrante do radical ABTS[•] baseia-se na habilidade dos antioxidantes em capturar este radical, causando o decréscimo de sua absorbância. O radical é obtido a partir de um precursor, o ácido 2,2'-azino-bis-3etilbenzotiazolina-6-sulfônico, composto cromóforo estável e solúvel em meios orgânicos e aquosos (TORRES et al., 2017). Desta forma, a atividade antioxidante das suspensões de SPE foi observada mediante a descoloração da solução de ABTS[•], que passa de azul esverdeado para incolor, conforme ilustrado na Figura 9.

De acordo com a Tabela 8, comparando as diferentes concentrações de SPE testadas, os valores de atividade antioxidante (radical ABTS[•]) foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), tanto no cultivo sem LED quanto no cultivo com LED, indicando que o aumento da concentração de SPE incrementa a atividade antioxidante, sendo este o mesmo comportamento observado nos ensaios baseados no sequestro do radical DPPH[•] (Tabela 7). Também da mesma forma que ocorreu com o radical DPPH[•], este comportamento não foi observado para o ácido ascórbico usado como padrão nos ensaios com o radical ABTS[•], não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações estudadas.

Figura 9 – Imagem ilustrativa referente ao ensaio de atividade antioxidante das suspensões de SPE de *E. meliloti* SEMIA 135 baseada no sequestro do radical ABTS*



Tubo a esquerda apresenta coloração azul esverdeada do radical ABTS* com o seu elétron desemparelhado (A); demais tubos (B e C) apresentam a coloração obtida com suspensões de SPE de *E. meliloti* SEMIA 135.

Tabela 8 – Atividade antioxidante (%) das suspensões de SPE de *E. meliloti* SEMIA 135 pelo método do sequestro do radical ABTS*

Concentração	Atividade Antioxidante (%)		Padrão ácido ascórbico
	Cultivo sem LED	Cultivo com LED	
1 mg/mL	25,72 ^{dB} ±0,00	13,99 ^{dC} ±0,20	93,21 ^{aA} ±0,01
2 mg/mL	39,32 ^{cB} ±0,04	25,72 ^{cC} ± 0,17	93,28 ^A ±0,00
3 mg/mL	50,05 ^{bB} ±0,01	35,41 ^{bC} ±0,14	93,21 ^{aA} ±0,02
4 mg/mL	57,49 ^{aB} ±0,20	54,21 ^{aC} ±0,00	93,14 ^{aA} ±0,03

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa nas atividades antioxidantes em diferentes concentrações de SPE a 95% de confiança (teste Tukey); letras maiúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa entre as suspensões e o padrão ácido ascórbico a 95% de confiança (teste Tukey).

Além disso, ao comparar-se as SPE obtidas em diferentes modos de cultivo, em todas as concentrações testadas houve diferenças significativas ($p < 0,05$) em termos de atividade antioxidante sobre o radical ABTS[•]. Entretanto, diferente dos ensaios com o radical DPPH[•], as SPE obtidas no cultivo sem iluminação apresentaram maiores valores de atividade antioxidante em relação ao cultivo com LED. Ambas SPE diferiram significativamente ($p < 0,05$) do ácido ascórbico, apresentando valores inferiores ao padrão. E diferente dos ensaios com DPPH[•], estes valores de atividade antioxidante sobre ABTS[•] foram bem inferiores aos observados com o ácido ascórbico, mesmo na maior concentração testada (4 mg/mL), com valores de 57,49% (cultivo sem LED) e 54,21% (cultivo com LED). Logo, as atividades de eliminação dos radicais ABTS[•] foram inferiores às dos radicais DPPH

Considerando os espectros DE FTIR-ATR, é possível que a eliminação de radicais ABTS[•] com as SPE do presente estudo se dá devido à existência de grupos carbonila e ácidos urônicos e do átomo de hidrogênio no grupo hidroxila. Segundo a literatura, a capacidade de eliminação de radicais livres está relacionada à presença de grupos funcionais como C=O, -COOH, -O- e -OH em sua estrutura (SUN et al., 2015).

Wang et al. (2018) estudaram a atividade antioxidante de EPS oriundos de *Astragalus* spp. com diferentes massas molares. O polissacarídeo de *Astragalus* spp. (APS0) original apresentou massa molar de 11,03 kDa, enquanto os demais polissacarídeos possuíam massas molares de 8,38 (APS1), 4,72 (APS2) e 2,60 kDa (APS3), respectivamente. Os quatro tipos de EPS apresentaram diferentes efeitos de eliminação do radical ABTS[•], demonstrando uma relação dose-dependente frente à massa molar dos EPS. Na concentração de 2,5 mg/mL, as taxas de eliminação de APS0, APS1, APS2 e APS3 foram 88,8%, 93,5%, 95% e 83,2%, respectivamente, o que indicou que APS2 com massa molar intermediária teve a maior atividade antioxidante.

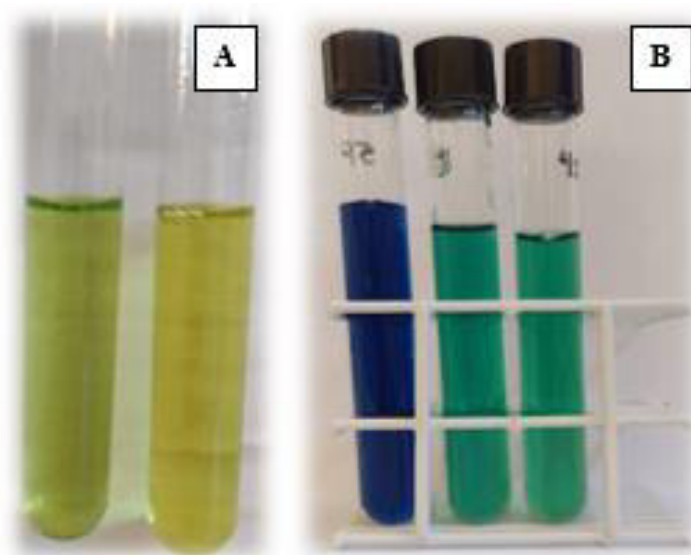
De acordo com a literatura, massa molar, volume molecular, viscosidade e solubilidade afetam a atividade biológica dos EPS. Os EPS de elevada massa molar apresentam estrutura química mais compacta com ligações de hidrogênio mais fortes, o que resulta em uma menor exposição de grupamentos ativos (WANG et al., 2016). Zhu et al. (2022) avaliaram a capacidade antioxidante de um EPS produzido por *L. curvatus* SJTUF 62116 do peixe *Gymnocypris przewalskii*. Segundo os autores, a atividade antioxidante do EPS na concentração de 5,0 mg/mL contra DPPH[•] e ABTS[•] foi de 84,50% e 92,53%, respectivamente.

Xing et al. (2005) relataram em seus estudos que o efeito de eliminação contra o radical superóxido de quitosana de baixa massa molar (9 kDa) foi mais potente do que a de baixa massa molar (760 kDa). Tal resultado pode estar relacionado às características da estrutura da quitosana, que possui dois grupos hidrogênio e um grupo amino em cada unidade monomérica. Segundo os autores, a quitosana de alta massa molar tem uma estrutura mais compacta, resultando em ligação de hidrogênio intramolecular mais forte, tornando os grupos de hidrogênio e amino restritos.

5.2.3.3 Poder redutor

O ensaio do poder redutor baseia-se na capacidade da amostra em doar elétrons para o íon ferricianeto, reduzindo-o a ferrocianeto que, na presença do íon férrico, forma o azul da Prússia (LUNA, 2016), conforme a Figura 10.

Figura 10 – Imagem ilustrativa referente ao ensaio de atividade antioxidante de suspensões contendo SPE de *E. meliloti* SEMIA 135 baseada no poder redutor sobre íons ferricianeto



(A) Íon ferricianeto na sua forma instável; (B) no tubo à esquerda, redução a ferrocianeto na presença de ácido ascórbico; demais tubos apresentam a coloração obtida com suspensões de SPE de *E. meliloti* SEMIA 135.

Grupos funcionais como sulfato, acetil, carboxila, hidroxila, carbonila, sulfidríla e tioéter presentes em moléculas de EPS podem atuar facilitando o processo de ligação

ao metal, por intermédio da formação de complexos de transferência de carga com aceptores de elétrons; inativando as moléculas altamente reativas através do mecanismo de transferência de um único elétron (CIRILLO; IEMMA, 2012). Desta forma, certos EPS microbianos doadores de elétrons conseguem converter a forma oxidada de ferro (Fe^{+3}), cloreto férrico, em ferroso (Fe^{+2}) devido suas características estruturais que atuam na conversão dos radicais livres em produtos estáveis, cessando a ação destas moléculas no meio celular (CRILLO; IEMMA, 2012).

A Tabela 9 mostra os dados obtidos relativos à atividade antioxidante das suspensões de SPE de *E. meliloti* SEMIA 135 em termos de poder redutor. É possível observar que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as SPE obtidas no cultivo sem iluminação e no cultivo com iluminação, sendo que para todas as concentrações testadas os valores obtidos foram superiores para as SPE do cultivo sem iluminação.

Por outro lado, ambas diferiram do padrão (ácido ascórbico), com resultados bem inferiores a este. Já com o aumento da concentração das SPE, para ambos os cultivos houve aumento nos valores de atividade antioxidante, com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações testadas, com incremento de 13,88% (1 mg/mL) para 33,55% (4 mg/mL) para SPE obtidas no cultivo sem iluminação; e de 12,07% (1 mg/mL) para 28,33% (4 mg/mL) para SPE oriundas do cultivo com iluminação. Entretanto, mesmo na concentração de 4 mg/mL em que os melhores resultados foram encontrados, a atividade antioxidante foi inferior à reportada para o ácido ascórbico.

Tabela 9 – Atividade antioxidante (%) das suspensões de SPE de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 pelo método do poder redutor

Concentração	Atividade Antioxidante (%)		Padrão ácido ascórbico
	Cultivo sem LED	Cultivo com LED	
1 mg/mL	13,88 ^{dA} ±0,08	12,07 ^{dB} ±0,02	100%
2 mg/mL	17,60 ^{cA} ±0,06	15,55 ^{cB} ±0,10	100%
3 mg/mL	26,02 ^{bA} ±0,18	23,86 ^{bB} ±0,35	100%
4 mg/mL	33,55 ^{aA} ±0,19	28,33 ^{aB} ±0,25	100%

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa nas atividades antioxidantes em diferentes concentrações de SPE a 95% de confiança (teste Tukey); letras maiúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa entre as suspensões e o padrão ácido ascórbico a 95% de confiança (teste Tukey).

Gonçalves (2014) avaliou a atividade antioxidante de EPS bacteriano extraído de *Gluconacetobacter diazotrophicus* pelo método do poder redutor. Os dados obtidos foram expressos tendo como padrão o percentual de atividade antioxidante para o ácido ascórbico na concentração de 0,2 mg/mL. A maior atividade antioxidante foi de 21% para uma concentração 200 mg/mL de EPS. Prathyusha et al. (2018) avaliaram a atividade antioxidante de um EPS extraído de fungos filamentosos de mangue (*Fusarium equiseti* ANP2) pelo método do poder redutor em diferentes concentrações. Como padrão também utilizaram ácido ascórbico nas concentrações de 0,5 a 3 mg/mL. O extrato na concentração de 3 mg/mL apresentou atividade antioxidante de 45%, valor próximo ao encontrado no presente estudo (30,06% na concentração 4 mg/mL na suspensão de SPE obtida no cultivo sem iluminação).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, SPE produzidas por *E. meliloti* SEMIA 135 em cultivo sem iluminação foram recuperadas por precipitação, testando-se diferentes agentes de precipitação (etanol e isopropanol), proporções de sobrenadante:solvente (1:1, 1:3 e 1:5) e temperatura (10 °C e 25 °C). A redução da temperatura e o aumento do volume de solvente adicionado não incrementaram a recuperação, condições estas que também representam um maior custo por ser necessária a refrigeração e um volume adicional de solvente. Desta forma, etanol e isopropanol se mostraram igualmente promissores, na proporção de 1:3 a 25 °C, não apresentando diferenças significativas entre si ($p>0,05$). Já no cultivo com iluminação, em que ambas as condições foram testadas, o isopropanol mostrou diferença significativa em relação ao etanol (ambos 1:3 a 25 °C). No entanto o etanol, pelo menor custo, foi selecionado com solvente para a precipitação de SPE obtidas tanto nos cultivos com iluminação LED azul nas primeiras 24 h de cultivo quanto nos cultivos sem iluminação.

A caracterização das SPE evidenciou a presença de grupos funcionais característicos encontrados em polissacarídeos rizobianos, incluindo a presença de ácidos urônicos e conformação β nas ligações glicosídicas. A comparação entre os espectros de FTIR-ATR mostrou semelhança entre os biopolímeros obtidos nos cultivos com e sem iluminação, entretanto diferenças significativas ($p<0,05$) foram observadas em termos de composição em carbono, hidrogênio e nitrogênio, sendo a presença deste último um indicativo da precipitação conjunta de uma fração proteica.

A atividade antioxidante das suspensões de SPE foram dose-dependente para ambas as amostras. O método do DPPH[•] apresentou um valor máximo de atividade antioxidante de 80,47% e 80,82%, respectivamente, para SPE do cultivo na ausência de luz e presença de luz (LED azul), na concentração de 4 mg/mL, sem diferenças significativas entre si ($p>0,05$) e próximo ao valor encontrado para o ácido ascórbico (86,61%); comportamento similar (dose-dependente) foi observado para ABTS e poder redutor, entretanto os valores obtidos foram bem inferiores em relação ao ácido ascórbico., havendo também diferenças significativas entre as SPE ($p<0,05$).

Portanto, ambas as SPE produzidas por *E. meliloti* SEMIA 135 exibiram atividade antioxidante frente aos radicais DPPH[•] e ABTS[•] e poder redutor, indicando potencial de exploração desta propriedade, sobretudo nos setores alimentício, cosmético e

farmacêutico. Desta forma, estudos futuros podem explorar sua possível aplicação como aditivo e ingrediente funcional em alimentos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar as SPE em função dos monômeros (monossacarídeos) que a constituem.
- Determinar a massa molar de ambas SPE e relacionar com seu potencial antioxidante.
- Avaliar sua atividade antioxidante frente a diferentes métodos *in vitro* e *in vivo*.
- Avaliar possíveis aplicações para as SPE na indústria alimentícia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIVOS INGREDIENTES. **Os tipos de gomas e suas aplicações na indústria.**

Editora Insumos, n. 116, mar. 2015. Disponível em:

https://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201601/2016010030333001453488327.pdf. Acesso em: 22 ago. 2022, 18:30:30.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANDHARE, P.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; MICHAUD, P.; PATHAK, H. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 1–8, 2017.

ANDREW, M.; JAYARAMAN, G. Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 487, 107881, 2020.

AYYASH, M.; STATHOPOULOS, C.; ABU-JDAYIL, B.; ESPOSITO, G.; BAIG, M.; TURNER, M. S.; BABA, A. S.; APOSTOLOPOULOS, V.; AL-NABULSI, A.; OSAILI, T. Exopolysaccharide produced by potential probiotic *Enterococcus faecium* MS79: characterization, bioactivities and rheological properties influenced by salt and pH. **LWT - Food Science and Technology**, v. 131, 109741, 2020.

AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. A new method for precipitating bacterial exopolysaccharides. **Biotechnology Techniques**, v. 10, n. 5, p. 341-344, 1996.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D.T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

BOMFIM, V. B.; LOPES NETO, J. H. P.; LEITE, K. S.; VIEIRA, E. A.; IACOMINI, M.; SILVA, C. M.; SANTOS, K. M. O.; CARDARELLI, H. R. Partial characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* CNPC003. **LWT - Food Science and Technology**, v. 127, 109349, 2020.

BONOMI, H. R.; POSADAS, D. M.; PARIS, G.; CARRICA, M. C.; FREDERICKSON, M.; PIETRASANTAC, L. I.; BOGOMOLNI, R. A.; ZORREGUIETA, A.; GOLDBAUM, F. A. Light regulates attachment, exopolysaccharide production, and nodulation in *Rhizobium leguminosarum* through a

LOV-histidine kinase photoreceptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 30, p. 12135–12140, 2012.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1 -12, 2011.

CARRIÓN, O.; DELGADO, L.; MERCADE, E. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 1028–1034, 2015.

CASTELLANE, T. C. L.; PERSONA, M. R.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. M. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515–522, 2015.

CASTELLANE, T. C. L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, I. D.; LOPES, E. M.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Characterization of new exopolysaccharide 74 production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 361–369, 2017.

CHEN, S. K.; TSAI, M. L.; HUANG, J. R.; CHEN, R. H. *In vitro* antioxidant activities of low-molecular-weight polysaccharides with various functional groups. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2699-2704, 2009.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, n. 6, p. 1161-1168, 2002.

CIRILLO, F. I.; IEMMA, F. **Antioxidant polymers: synthesis, properties, and applications**. Wiley-Scrivener, 2012. 520 p.

DANALACHE, F.; MATA, P.; MOLDAO-MARTINS, M.; ALVES, V. D. Novel mango bars using gellan gum as gelling agent: rheological and microstructural studies. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 576-583, 2015.

DEEPIKA, K. V.; RAGHURAM, M.; KARIALI, E.; BRAMHACHARI, P. V. Biological responses of symbiotic *Rhizobium radiobacter* strain VBCK1062 to the

arsenic contaminated rhizosphere soils of mung bean. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 134, p. 1-10, 2016.

DILNA, S. V.; SURYA, H.; ASWATHY, R. G.; VARSHA, K. K.; SAKTHIKUMAR, D. N.; PANDEY, A.; NAMPOOTHIRI, K. M. Characterization of an exopolysaccharide with potential health- benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1179–1186, 2015.

DOLAN, L. C.; MATULKA, R. A.; LEBEAU, A. L.; BOULET, J. M. Two new nontoxic, non-pathogenic strains of *Sphingomonas elodea* for gellan gum production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 78, p. 37-44, 2016.

DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; SÉRVULO, E. F. C.; LOPES, L. M. A.; COSTA, A. C. A.; BARROS, A. Effect of process parameters on production of a biopolymer by *Rhizobium* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 114, p. 639–652, 2004.

EKELHOF, A.; MELKONIAN, M. Enhanced extracellular polysaccharide production and growth by microalga *Netrium digitus* in a porous substrate bioreactor. **Algal Research**, v. 28, p. 184-191, 2017.

FARIA, L. H. G. B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo**. 2002. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

FENG, C.; LOTTI, T.; CANZIANI, R.; LIN, Y.; TAGLIABUE, C.; MALPEI, F. Extracellular biopolymers recovered as raw biomaterials from waste granular sludge and potential applications: a critical review. **Science of the Total Environment**, v. 753, 142051, 2021.

ELLIS, A. L.; NORTON, A. B.; MILLS, T. B.; NORTON, I. T. Stabilisation of foams by agar gel particles. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 222-228, 2017.

EMBRAPA. **Fixação biológica de nitrogênio**. Norma Técnica, 2020. Disponível em <https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>. Acesso em: 10 de mar. 2021, 16:30:30.

FLEMMING, H. C. EPS – then and now. **Microorganisms**, v. 4, 41, 2016.

FORTE, I. H.; GARCÍA, M. C. N. Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de un aislado de rizobio. **Cultivos Tropicales**, v. 39, n. 3, p. 87-90, 2018.

FREIRE, N. B.; PIRES, L. C.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Antimicrobial and antibiofilm activity of silver nanoparticles against *Aeromonas* spp. isolated from aquatic organisms. **Brazilian Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 244-249, 2018.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388-398, 2011.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

GOMES, R. J. **Produção simultânea de celulose e ácido acético, por bactérias de vinagres, a partir de melaço de soja**. 2017. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) — Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

GONÇALVES, T. T. **Atividade antioxidante do exopolissacarídeo bacteriano extraído de *Gluconacetobacter diazotrophicus***. 2014. 70 f. Dissertação (Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

GONZALES, R.; JOHNS, M. R.; GREENFIELD, P. F.; PACE, G. W. Phase equilibria for xanthan gum in ethanol-water solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 13, n. 3, p. 317-333, 1990.

GONZÁLEZ, C. H. **Produção de exopolissacarídeos por rizóbios em meios de cultivo com coprodutos lácteos**. 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) — Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

HALL, R. M.; FAVARO, C. P.; OHARA, M. A.; GARCIA, C. C. Biopolímeros sintetizados por linhagem selvagem de *Escherichia coli*. **Cultivando o Saber**, v. 8, n. 1, p. 95-106, 2015.

HU, X.; PANG, X.; WANG, P. G.; CHEN, M. Isolation and characterization of an antioxidant exopolysaccharide produced by *Bacillus* sp. S-1 from Sichuan Pickles. **Carbohydrate Polymers**, v. 204, p. 9-16, 2019.

KAGIMURA, F. Y.; CUNHA, M. A. A.; BARBOSA A. M.; DEKKER, R. F. H.; MALFATTI, C. R. M. Biological activities of derivatized D-glucans: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588-598, 2015.

KARR, D. B.; LIANG, R. T.; REUHS, B. L.; EMERICH, D. W. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. **Planta**, v. 211, p. 218-226, 2000.

LI, W.; JI, J.; RUI, X.; YU, J.; TANG, W.; CHEN, X. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 732-739, 2014.

LIU, Y.; XU, Z.; ZHANG, W.; DUAN, J.; JIANG, J.; SUN, D. Characterization of fractional polysaccharides from *Gleditsia sinensis* and *Gleditsia microphylla* gums. **Molecules**, v. 21, n. 12, 1745, 2016.

LOMAN, A. A.; JU, L.-K. Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1046- 1057, 2016.

LUNA, W. N. S. **Acetilação do exopolissacrídeo (1→6)-β-D-glucana (Lasiodiplodana): derivatização química e caracterização**. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

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

MAHGOUB, A. M.; MAHMOUD, M. G.; SELIM, M. S.; EL AWADY, M. E. Exopolysaccharide from marine *Bacillus velezensis* MHM3 induces apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells through a mitochondrial pathway. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 7, p. 1957-1963, 2018.

MAHMOUD, M. G.; MOHAMED, S. S.; ASKER, M. S.; HASSAN, A. I. The chemical structure and gastroprotective effect of *Pseudomonas* - exopolysaccharide in rats. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 5, p. 243-259, 2016.

MANTOVANI, D. **Estudo da recuperação e hidrólise de isoflavonas e carboidratos obtidos a partir do melão de soja**. 2013. 143 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) — Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999. 24 p.

MIRANDA, L. **Produção de fermentado acético a partir de melaço de soja**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) — Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

MOHAMED, S. S.; AMER, S. K.; SELIM, M. S.; RIFAAT, H. M. 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.

MONTEIRO, N. K.; ARANDA-SELVERINO, G.; EXPOSTI, D. T. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 705-708, 2012.

MORAIS JÚNIOR, W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, v. 123, p. 26–34, 2016.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MORETTO, C.; CASTELLANE, T. C. L.; LOPES, E. M.; OMORI, W. P.; SACCO, L. P.; LEMOS, E. G. M. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. **International of Journal Biological Macromolecules**, v. 81, p. 291-298, 2015.

NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1513-1519, 2003.

NEHAL, F.; SAHNOUN, M.; SMAOUI, S.; JAOUADI, B.; BEJAR, S.; MOHAMMED, S. Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, p. 10-19, 2019.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

OLIVEIRA, J. M. **Caracterização do exopolissacarídeo produzido por *Mesorhizobium loti* Semia 816 a partir de glicerol residual**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) — Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

SANTOS, J. T. **Produção de exopolissacarídeos por *Ensifer meliloti* em frascos agitados e biorreator de bancada: condições de processo e caracterização parcial do biopolímero**. 2022. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) — Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2022.

OLIVEIRA, J. M. **Produção de substâncias poliméricas extracelulares a partir de bactérias diazotróficas utilizando melaço de soja**. 2021. 98 f. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) — Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2021.

OLIVEIRA, J. M.; AMARAL, S. A.; BURKERT, C. A. V. Rheological, textural and emulsifying properties of an exopolysaccharide produced by *Mesorhizobium loti* grown on a crude glycerol-based medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2180-2187, 2018.

OLIVEIRA, J. M.; MICHELON, M.; BURKERT, C. A.V. Biotechnological potential of soybean molasses to produce extracellular polymers by diazotrophic bacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, 101608, 2020.

OSIRO, D.; FRANCO, R. W. A.; COLNAGO, L. A. Spectroscopic characterization of the exopolysaccharide of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Cu²⁺ resistance mechanism, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 1339-1345, 2011.

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

PECIN, S. B. **Melaço de soja como substrato para a produção microbiana de (1→6)-β-D-glucana: avaliação do melaço bruto e do hidrolisado químico**. 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.

PEREIRA, G. V. M.; KARP, S. G.; LETTI, L. A. J.; PAGNONCELLI, M. G. B.; FINCO, A. M.; MACHADO, M. R.; SOCCOL, C. R. Bioactive polysaccharides produced by microorganisms: production and applications. In: SARAN, S.; BABU, V.; CHAUBEY, A. (eds.). **High value fermentation products: human welfare**. Scrivener Publishing LLC, 2019. p. 231-251.

PESSÔA, M. G.; VESPERMANN, K. A. C.; PAULINO, B. N.; BARCELOS, M. C. S.; PASTORE, G. M.; MOLINA, G. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 2, p. 319-339, 2019.

PIERMARIA, J. **Polisacaridos de bacterias lácticas: su aplicación en alimentos funcionais**. 2008. 223 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 2008.

PRATHYUSHA, A. M. V. N.; SHEELA, G. M.; BRAMHACHARI, P. V. Chemical characterization and antioxidant properties of exopolysaccharides from mangrove filamentous fungi *Fusarium equiseti* ANP2. **Biotechnology Reports**, v. 19, e00277, 2018.

PRIMO, E. D.; COSSOVICH, S.; NIEVAS, F.; BOGINO, P.; HUMM, E. A.; HIRSH, A. M.; GIORDANO, W. Exopolysaccharide production in *Ensifer meliloti* laboratory and native strains and their effects on alfalfa inoculation. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 101, p. 391–398, 2020.

PRIYANKA, P.; ARUN, A. B.; ASHWINI, P.; REKHA, P. D. Versatile properties of an exopolysaccharide R-PS18 produced by *Rhizobium* sp. PRIM-18. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 215–221, 2015.

RAJOKA, M. S. R.; MEHWISH, H. M.; ZHANG, H.; ASHRAF, M.; FANG, H.; ZENG, X.; WU, Y.; KHURSHID, M.; ZHAO, L.; HE, Z. Antibacterial and antioxidant activity of exopolysaccharide mediated silver nanoparticle synthesized by *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese koumiss. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 186, 110734, 2020.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231-1237, 1999.

RIBEIRO, V. A. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos a partir de bactérias diazotróficas cultivadas em meios à base de glicerol residual**. 2015. 192 f.

Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2015.

RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A.V. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium*: production, composition and rheological properties. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2016.

RODRIGUES, B. C. G. **Aproveitamento do melaço de soja para produção de biometano em reator UASB**. 2019. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.

ROESCH, L. F. W. **Ocorrência e distribuição de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de milho**. 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

ROESLER, B. C. S. **Exopolissacarídeos de *Mesorhizobium* sp. Semia 816 partir de monossacarídeos constituintes da biomassa lignocelulósica e hidrolisado de casca de soja**. 2021. 139 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2021.

ROMÃO, B. B.; SILVA, F. B.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L. Ethanol production from hydrolyzed soybean molasses. **Energy & Fuels**, v. 26, p. 2310–2316, 2012.

SANTOS, S. M. **Avaliação das atividades antioxidantes de exopolissacarídeos (EPS) produzidos a partir de *Enterococcus* sp. isolado de queijo coalho artesanal**. 2022. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2022.

SCHMID, J.; SIEBER, V.; REHM, B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 496, 2015.

SEMPREBOM, T. **Fixação biológica de nitrogênio e biotecnologia a favor das plantas**. Profissão Biotec: 2018. Disponível em: <https://profissaobiotec.com.br/fixacao-biologica-de-nitrogenio-e-biotecnologia-favor-das-plantas/> Acesso em: 10 de mar. 2021, 16:50:30.

SERRATO, V. R. **Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas**, 2008. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SHANG, H.; WANG, M.; LI, R.; DUAN, M.; WU, H.; ZHOU, H. Extraction condition optimization and effects of drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Astragalus cicer* L. **Scientific Reports**, v. 8, 3359, 2018.

SHI, Y.; HUANG, J.; ZENG, G.; GU, Y.; CHEN, Y.; HU, Y.; TANG, B.; ZHOU, J.; YANG, Y.; SHI, L. Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: an overview. **Chemosphere**, v. 180, p. 396-411, 2017.

SILVA, J. G. M. **Estudo químico do hidrogel de celulose bacteriana e da sua toxicidade local, renal e hepática em ratos wistar**. 2020. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2020.

SILVA, R. T.; BERSANET. **Produção de levana e suas aplicações em cosméticos**. Virtual Books, 2019. Disponível em: <file:///C:/Users/Administrator/Downloads/producao-de-levana-e-sua-aplicacao-em-cosmeticos.pdf>. Acesso em: 10 de jan. 2023, 21:09:30.

SILVESTRE, A. G. **Características fisiológicas de bactérias diazotróficas isoladas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. 2017. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2017.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; THOLOZAN, J.-L.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156–8163, 2008.

SKORUPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KRÓL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, v. 5, 7, 2006.

SOUSA, B. F. S.; CASTELLANE, T. C. L.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. M. *Rhizobium* spp exopolysaccharides production and xanthan lyase use on its structural modification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 424-435, 2019.

STAUDT, A. K.; WOLFE, L. G.; SHROUT, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 3, p. 197–206, 2012.

SUN, L.; WANG, L.; LI, J.; LIU, H. Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from two marine Chrysophyta. **Food Chemistry**, v. 160, p. 1-7, 2015.

TANG, W.; DONG, M.; WANG, W.; HAN, S.; RUI, X.; CHEN, X.; JIANG, M.; ZHANG, Q.; WU, J.; LI, W. Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 654-664, 2017.

THEIS, T. V.; CALEGARI, G. C.; SANTOS, V. A. Q.; JUNIOR, H. E. Z.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CUNHA, M. A. A. Exocellular (1→6)-β-D-glucan (lasiodiplodan): carboxy methylation, thermal behavior, antioxidant and antimicrobial activity. **American Journal of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 19-33, 2017.

TORRES, P. B.; PIRES, J. S.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. **Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS' em microplaca**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017.

TRABELSI, I.; KTARI, N.; SLIMA, S. B.; TRIKI, M.; BARDAA, S.; MNIF, H.; BEN SALAH, R. Evaluation of dermal wound healing activity and in vitro antibacterial and antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 194-201, 2017.

VIANA, P. A.; REZENDE, S. T.; FALKOSKI, D. L.; LEITE, T. A.; JOSÉ, I. C.; MOREIRA, M. A.; GUIMARÃES, V. M. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α-galactosidases. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 331-337, 2007.

VIEIRA, J.; TRESBACH, R. H.; CASTRO, R. M.; ROSA, J. V. S.; STEFENON, V. M.; ROLL, R. J. Crescimento de *Rhizobium loti* e *Bradyrhizobium japonicum* sob diferentes fontes de carbono e pH. In: 8º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2020, Santana do Livramento. **Anais...** Santana do Livramento: SIEPE, 2020, v. 8, n. 2, p.1-2.

WANG, J.; HU, S.; NIE, S.; YU, Q.; XIE, M. Reviews on mechanisms of *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 5692852, 2016.

WANG, X.; SHAO, C.; LIU, L.; GUO, X.; XU, Y.; LÜ, X. Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1173-1184, 2017.

WANG, J.-M.; SUN, X.-Y.; OUYANG, J.-M. Structural characterization, antioxidant activity, and biomedical application of *Astragalus* polysaccharide degradation Products. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, 5136185, 2018.

WANG, J.; ZHAO, X.; TIAN, Z.; YANG, Y.; YANG, Z. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 16–25, 2015.

XU, R.-B.; YANG, X.; WANG, J.; ZHAO, H.-T.; LU, W.-H.; CUI, J.; CHENG, C.-L.; ZOU, P.; HUANG, W.-W.; WANG, P.; LI, W.-J.; HU, X.-L. Chemical composition and antioxidant activities of three polysaccharide fractions from pine cones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 14262-14277, 2012.

YANG, H.; WANG, Z.; LIN, M.; YANG, S.-T. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 1-9, 2018.

YANG, Y.; FENG, F.; ZHOU, Q.; ZHAO, F.; DU, R.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 529-535, 2018.

YANG, Z.; ZHENG, Y.; CAO, S. Effect of high oxygen atmosphere storage on quality, antioxidant enzymes, and DPPH-radical scavenging activity of Chinese bayberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 176-181, 2009.

YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27-32, 1995.

ZAROOUR, K., LLAMAS, M. G.; PRIETO, A.; RÚAS-MADIEDO, P. DUEÑAS, M. T.; PALENCIA, P. F.; AZNAR, R.; KIHAL, M.; LÓPEZ, P. Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 646–657, 2017.

ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Succinoglycan and galactoglucan. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 2-3, p. 139-144, 1997.

ZHANG, L.; ZHAO, B.; LIU, C.-J.; YANG, E. Optimization of biosynthesis conditions to produce exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the

exopolysaccharides antioxidant activity test. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 334-345, 2020.

ZHAO, H.; LI, J.; ZHANG, J.; WANG, X.; LIU, M.; ZHANG, C.; JIA, L. Hepatoprotective and *in vitro* antioxidant effects of native depolymerised-exopolysaccharides derived from *Termitomyces albuminosus*. **Scientific Reports**, v. 7, 3910, 2017.

ZHAO, W.; ZHANG, J.; JIANG, Y.-Y.; ZHAO, X.; HAO, X.-N.; LI, L.; YANG, Z.-N. Characterization and antioxidant activity of the exopolysaccharide produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GSBa-1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 1282-1292, 2018.

ZHU, J.; TAN, Z.; ZHANG, Z.; SHI, X. Characterization on structure and bioactivities of an exopolysaccharide from *Lactobacillus curvatus* SJTUF 62116. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 210, p. 504-517, 2022.

9 APENDICES

APÊNDICE A – Valores médios (n=3) em transmitância ao longo do tempo (min) para DPPH

Ácido Ascórbico										
SPE	T(0)	T(5)	T(15)	T(30)	T(45)	T(60)	T(75)	T(90)	T(105)	T(120)
1 mg/mL	83,20	83,00	83,00	82,50	82,50	81,90	81,90	81,60	81,60	81,60
2 mg/mL	83,40	84,50	83,00	83,20	83,20	82,00	81,60	81,10	81,20	81,30
3 mg/mL	84,20	82,90	81,90	81,40	81,20	81,10	81,10	81,10	81,10	81,10
4 mg/mL	83,20	83,70	83,00	82,00	82,20	81,80	81,50	81,50	81,50	81,10

Cultivo sem LED										
SPE	T(0)	T(5)	T(15)	T(30)	T(45)	T(60)	T(75)	T(90)	T(105)	T(120)
1 mg/mL	53,50	56,50	56,30	51,20	51,80	51,60	51,80	51,70	51,80	51,70
2 mg/mL	55,00	55,10	55,40	56,00	56,50	57,00	57,20	57,10	57,20	57,10
3 mg/mL	64,10	64,00	64,60	64,40	64,10	64,00	64,60	67,40	67,50	67,50
4 mg/mL	70,10	70,20	71,60	72,40	73,00	74,50	74,60	74,20	74,20	74,10

Cultivo com LED										
SPE	T(0)	T(5)	T(15)	T(30)	T(45)	T(60)	T(75)	T(90)	T(105)	T(190)
1 mg/mL	56,60	52,30	56,20	58,50	55,10	57,70	59,40	59,30	59,30	59,10
2 mg/mL	59,10	59,30	59,50	59,10	59,70	59,20	60,40	62,20	62,10	62,40
3 mg/mL	70,20	70,50	71,70	71,70	70,10	70,10	70,20	69,90	69,40	69,20
4 mg/mL	73,90	75,80	76,30	75,90	74,80	74,40	74,30	74,60	74,20	74,30

T: transmitância (%).

APÊNDICE B – Valores médios (n=3) em transmitância ao longo do tempo (min) para ABTS

Ácido Ascórbico						
SPE	T(1)	T(2)	T(3)	T(4)	T(5)	T(6)
1 mg/mL	90,30	89,40	89,70	89,6	89,50	89,60
2 mg/mL	83,20	89,80	89,70	89,60	89,70	89,70
3 mg/mL	90,10	89,90	89,50	89,50	89,50	89,60
4 mg/mL	89,90	89,90	89,50	89,50	89,50	89,50

ABTS Cultivo sem LED						
SPE	T(1)	T(2)	T(3)	T(4)	T(5)	T(6)
1 mg/mL	30,11	29,90	30,10	30,10	30,20	30,10
2 mg/mL	37,50	37,40	37,40	37,40	37,40	37,50
3 mg/mL	44,70	44,20	44,60	44,60	44,50	44,60
4 mg/mL	49,80	50,10	50,20	50,20	50,20	50,30

ABTS Cultivo com LED						
SPE	T(1)	T(2)	T(3)	T(4)	T(5)	T(6)
1 mg/mL	24,50	24,90	24,90	24,80	24,80	24,90
2 mg/mL	29,10	30,50	30,40	30,20	30,20	30,10
3 mg/mL	34,20	35,10	35,20	35,40	35,40	35,20
4 mg/mL	47,50	47,80	47,90	47,90	47,90	47,70

T: transmitância (%).