UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

EXOPOLISSACARÍDEOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO EM MEIO SORO DE LEITE, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

ELAINE CRISTINA DA SILVA

Recife, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

EXOPOLISSACARÍDEOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO EM MEIO SORO DE LEITE, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

ELAINE CRISTINA DA SILVA

.

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Recife, 2022

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

S586e Silva, Elaine Cristina
EXOPOLISSACARÍDEOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS:: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO EM MEIO SORO DE LEITE, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE IN VITRO / Elaine Cristina Silva. - 2022.
85 f. : il.

Orientadora: Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares.
Coorientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.

1. Biotecnologia. 2. Microbiologia. 3. Bioquímica. I. Soares, Maria Taciana Cavalcanti Vieira, orient. II. Porto, Ana Lucia Figueiredo, coorient. III. Título

CDD 636.089

EXOPOLISSACARÍDEOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO EM MEIO SORO DE LEITE, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

ELAINE CRISTINA DA SILVA

Data de aprovação 30/06/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. M° Taciana Cavalcanti Vieira Soares- Presidente
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- UFRPE

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto- Coorientadora
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- UFRPE

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira
Departamento de Medicina Veterinária – UFAPE

Prof. Dr. Paulo Antônio Galindo Soares
Departamento de Bioquímica - UFPE

Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- UFRPE

Profa. Dra. Tatiana Souza Porto
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- UFRPE

RECIFE, 2022

Dedico à

família, amigos e professores queridos.

AGRADECIMENTOS

Com o fechamento desse ciclo, nada mais gratificante do que ter a ciência das pequenas conquistas. Apesar de tantos empecilhos em meio a pandemia, hoje, estou aqui escrevendo essa dedicatória de gratidão aos amigos e profissionais envolvidos neste trabalho.

Meu primeiro "OBRIGADA!" vai para a profa. Taciana, afinal foram 8 anos de convivência científica, e como resultado um carinho enorme que vou levar para a vida toda. Segundamente, sou grata por todo apoio e atenção da profa. Ana Porto. Eu fui agraciada por ter convivido em um ambiente onde as pessoas respeitam e ajudam umas as outras. Guardarei todos em minhas boas memórias.

Agradeço as professoras Raquel e Tatiana que, fora toda simpatia, não medem esforços para ajudar. Também sou grata ao professor Romero, pessoa que nos inspira com seu profissionalismo e nos acalma com mensagens de sabedoria.

Um grande abraço em todos os amigos e colegas do Labctebio e Cenapesq. A propósito, presto minha homenagem a nossa querida Ieda, que nos deixou e foi morar no céu.

E falando em pessoas maravilhosas, posso dizer que sou feliz por está cercada de amigos queridos - Priscila Calaça, José Noé, Leandro Paes, Profa. Taciana, Priscila Santos, Ketyline, Ana Cláudia, Erika, Viviane, Emília, Eduardo e Nakeyda. Obrigada, vocês! Pelo apoio e por proporcionarem momentos de alegria e

leveza.

Agradeço a minha família: mãe, pelo apoio; tia, pelo carinho e dona Maria, por ter permanecido na minha vida como uma segunda mãe.

Por fim, meus agradecimentos aos órgãos de fomento FACEPE, CNPq e CAPES, pelo apoio ao longo da minha jornada acadêmica. Agradeço ao PPGBA pelo excelente trabalho de suporte acadêmico e, obviamente, a minha querida universidade UFRPE, a ruralinda. Meu MUITO OBRIGADA!

Não creias na força de quem bajula os fortes, de quem humilha os fracos, de quem não sorri diante da criança brincando, de quem não tem olhos para a beleza e é incapaz de parar, mesmoque na maior pressa, para contemplar uma flor.

Dom Hélder Câmara

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo produzir, caracterizar e avaliar o efeito antioxidante de exopolissacarídeos (EPS) produzidos por bactérias ácido láticas (BAL) cultivadas em soro de leite. Um total de 64 cepas de BAL isoladas de queijo de coalho foram testadas para seleção da melhor produtora de EPS. Após seleção, a cepa foi identificada por métodos moleculares. A influência da temperatura, pH e tempo de fermentação foi avaliada para determinar as condições ótimas para produção de EPS em meio soro de queijo. O EPS obtido também foi parcialmente caracterizado e avaliado em concentrações de 0,2 a 2 mg/mL quanto ao efeito antioxidante contra os radicais DPPH, ABTS, hidroxila e superóxido. Como resultados, a cepa (133v) selecionada apresentou concentração de 5,58 mg/mL e após teste de genotipagem, foi constatado que se trata da bactéria de espécie *Enterococcus faecium*. A partir do delineamento experimental estatístico, foi possível obter 21,74 mg/mL de EPS em condições otimizadas, tais quais, o pH foi fixado em 6, temperatura e tempo de fermentação apresentaram níveis ótimos em 42 °C e 22 h respectivamente. Em sua composição, foi observado características típicas de carboidratos, como a presença de grupos hidroxila, amina, carboxila, proteínas e ácido urônico. Nos ensaios de atividade antioxidante, o EPS apresentou potencial, em todas as concentrações, de redução do radical DPPH, ABTS e superóxido com capacidade máxima de 27 %, 72,20 % e 43,23 %, respectivamente. Em conclusão, este estudo mostrou que foi possível obter um biopolímero natural com potencial aplicação na indústria alimentícia através da fermentação de meio de baixo custo, nutricionalmente rico e abundante.

Palavras-chave: Efluente; otimização; propriedades biológicas; carboidratos.

ABSTRACT

The present work focused on production, characterization, and determination of antioxidant effects of exopolysaccharides (EPS) produced by lactic acid bacteria cultivated in cheese whey. A total of 64 strains of lactic acid bacteria isolated from “coalho” cheese were tested to select the strain with appreciable amounts of EPS. After selection, the strain was identified by molecular methods. The temperature, pH and fermentation time influence were evaluated to determine the optimal conditions for EPS production in cheese whey medium. The EPS obtained was also partially characterized and evaluated at concentrations from 0.2 to 2 mg/mL for the antioxidant effect against DPPH, ABTS, hydroxyl and superoxide radicals. As a result, the selected strain (133v) showed concentration of 5.58 mg/mL The genotyping test revealed the *Enterococcus faecium* species. With the statistical experimental design was possible to find the optimal conditions to EPS production which the temperature was found to be 42 °C and fermentation time of 22 h. Under these conditions, was obtained 21.74 mg/mL of EPS. The partial characterization of EPS revealed the presence of functional groups such as hydroxyl, amine, carboxyl, proteins, and uronic acid. The in vitro antioxidant assay of the EPS showed good scavenging effects on DPPH, ABTS and superoxide radicals with maximal capacity of 27%, 72,20% and 43,23%, respectively. However, the hydroxyl radical was reduced by EPS from the concentration of 2 mg/mL with 1.29%. In conclusion, this work showed that was possible to obtain a natural biopolymer with potential application in the food industry through the fermentation of a low-cost, nutritionally rich and abundant medium.

Keywords: Effluent; optimization; biological properties; carbohydrates.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. REVISÃO DA LITERATURA 16
2.1 Exopolissacarídeos 16
2.2 Exopolissacarídeos produzidos por bactérias ácido láticas 18
2.3 Propriedades biotecnológicas de exopolissacarídeos produzidos por bactérias ácido láticas 19
2.3.1 Propriedades tecnológicas 19
2.3.2 Propriedades funcionais 22
2.4 Produção de exopolissacarídeos por bactérias ácido láticas 24
2.5 Soro de leite como via fermentativa de bactérias ácido láticas para produção de exopolissacarídeos 26
3. OBJETIVOS 30
3.1 Geral 30
3.2 Específicos 30
4. REFERÊNCIAS 31
CAPÍTULO 1 41
RESUMO 43
1. INTRODUÇÃO 45
2. MATERIAIS E MÉTODOS 46
2.1 Microrganismo e preparo do meio de cultura 46
2.2 Seleção da bactérias ácido láticas quanto a produção de .exopolissacarídeos 47
2.3 Extração, purificação e análises químicas de EPS 47
2.4 Análise de infravermelho 48
2.5 Identificação molecular 48
2.6 Delineamento experimental estatístico para produção de EPS 49
2.7 Determinação do potencial antioxidante in vitro de EPS 50
2.7.1 DPPH 50
2.7.2 Redução do radical hidroxila 50
2.7.3 Redução do radical ABTS 51
2.7.4 Redução do íon superóxido 51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
3.1 Seleção de bactéria ácido lática quanto a síntese de EPS 52
3.2 Identificação molecular da BAL produtora de EPS 53
3.3 Caracterização parcial da composição química 54
3.4 Otimização da produção de EPS por delineamento experimental estatístico 55

3.4.1 Planejamento fatorial completo 55
3.4.2 Delineamento experimental central composto para produção de EPS. 57
3.4.3 Validação 60
3.5 Determinação da atividade antioxidante in vitro 60
4. CONCLUSÃO 63
5. REFERÊNCIAS 64
CAPÍTULO 2- ANEXOS 69
Can postbiotic shows antiviral effects against COVID-19? 69
O efeito dos exopolissacarídeos obtidos a partir de bactérias ácido lácticas como prebiótico: uma revisão sistemática 70

LISTA DE FIGURA

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura química de homopolissacarídeo produzido por bactéria ácido lática. .....

Figura 2. Células de *Enterococcus faecalis* envoltas por substância descrita pelo estudo como cremosa e branca em placa contendo ágar MRS……

Figura 3. Algumas propriedades biológicas relatadas em estudos com EPS proveniente de bactérias ácido láticas.....

Figura 4. Algumas aplicações para o reaproveitamento do soro de leite de leite……

ARTIGO

Figura 1. Resultados da produção de EPS por BAL pela fermentação do soro de queijo…….

Figura 2. Espectroscopia em infravermelho para presença de grupos funcionais em EPS133v…….

Figura 3. Gráfico de pareto ilustrando os efeitos das variáveis independentes: temperatura, pH e tempo de fermentação.....

Figura 4. Gráfico de superfície de resposta contendo os efeitos da combinação de variáveis sobre a produção de EPS133v em soro de queijo…….

Figura 5. Atividades antioxidantes in vitro do EPS133v contra diferentes radicais. (a) DPPH, (b) Hidroxil, (c) ABTS e (d) Superóxido.....

LISTA DE TABELA

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Características de heteropolissacarídeos (HePS) e homopolissacarídeos (HoPS) de bactérias ácido láticas…….

Tabela 2. Aplicações industriais e funcionais de exopolissacarídeos produzidos por bactérias ácido láticas……

Tabela 3 Concentração média dos principais componentes presentes no soro de leite de vaca…….

ARTIGO

Tabela 1. Variáveis independentes e níveis codificados para produção de EPS por BAL.....

Tabela 2. Caraterização do soro de queijo de coalho.....

Tabela 3. Sequenciamento obtido para identificação da cepa 133v…….

Tabela 4. Matriz contendo o delineamento experimental completo realizado para avaliar a influência das variáveis independentes sobre a produção de EPS por BAL.

Tabela 5. Matriz contendo os parâmetros do modelo linear considerando a influência das variáveis independentes sobre a produção de EPS por BAL (resultados reais e previstos), de acordo com o planejamento fatorial completo.....

Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) dos modelos linear e quadrático para produção de EPS…….

1. INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros como os peptideoglicanos e ácidos teicóicos, encontrados na parede celular ou no ambiente circundante (ULLRICH et al., 2009; DABA et al., 2021).

Os EPS podem ser classificados como homopolissacarídeos, quando compostos por um único tipo de monossacarídeo, ou heteropolissacarídeos, quando compostos por dois ou mais açúcares distintos. Além disso, os açúcares podem ser modificados por porções não carboidratos, como: acetato, piruvato, sulfato e succinato (LEIGH et al.,1992 BARUAH et al., 2016).

Vários microrganismos como microalgas, fungos, bactérias e leveduras produzem EPS com a finalidade de aumentar a proteção e adaptabilidade ambiental. Uma variedade de gêneros pertencentes ao grupo das bactérias ácido láticas (BAL) são capazes de sintetizar diferentes classes de EPS desempenhando um papel importante no âmbito alimentar, uma vez que possuem status GRAS (Generally Recognized as Safe) (POTYSZ et al., 2013; DAVE et al., 2016; GASPAR et al., 2003).

Devido às alegações de benefícios para a saúde humana, os EPS produzidos por BAL têm sido bastante explorados pela comunidade científica, além de possuírem grande versatilidade para alimentos e produtos farmacêuticos (BOTELHO et al., 2014; BAJPAI et al., 2016; VENDRAMIN et al., 2017). Esses polímeros, em especial, possuem propriedades tecnológicas que atendem as expectativas de mercado devido a sua capacidade de melhorar os aspectos físicos e sensoriais de alimentos, tais como viscosidade aumentada, sinérese reduzida, efeito espessante, emulsificante e estabilizante; como resultado temos um produto com características mais atrativas.

Alguns estudos consideram os requisitos de crescimento de BAL como um obstáculo para sua aplicação e até mesmo para a obtenção de bioativos naturais, uma vez que necessitam de fontes como aminoácidos, precursores de ácido nucleico e vitaminas, o que pode tornar qualquer forma de processamento caro e dispendioso. Porém, apesar da natureza fastidiosa desses microrganismos, uma grande variedade de fontes de carbono está disponível para a produção de EPS, como sacarose, manitol, glicose, maltose, amido, lactose, metanol e n-alcanos (SHUKLA et al., 2019). Segundo Morin et al. (1998), são opções que estimulam o rendimento de EPS que podem ser obtidos por resíduos agroindustriais em grande escala e em forma pura

para escala de laboratório.

O soro de leite é considerado um resíduo valioso, pois se tornou um recurso de baixo custo com potencial para produção de vários produtos de valor agregado. O soro é um subproduto resultante da fabricação de queijo que possui alta demanda nutricional, sendo os componentes mais abundantes: lactose, proteínas solúveis, lipídios e sais minerais (DAUFIN et al., 1998; CARVALHO et al., 2013). Além de apresentar valor nutricional, o soro de queijo é considerado um dos resíduos mais poluentes e abundantes representando 85-95% do volume de leite. Estima-se que para produção de 1kg de queijo é gerado 10L de soro, sendo essencial o tratamento adequando de efluente, uma vez que seu despejo pode causar impactos negativos no meio ambiente devido a alta demanda de componentes orgânicos (MOLLEA et al., 2013; GHALY et al., 2007).

Considerando os relatos sobre as propriedades biológicas e tecnológicas de EPS produzidos por BAL, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial biotecnológico de BAL isolada de queijo de coalho artesanal, a fim de obter um biopolímero natural através da fermentação de um efluente nutricionalmente rico e abundante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Exopolissacarídeos

O termo exopolissacarídeo ou EPS é amplamente utilizado para classificar polímeros de carboidratos que são encontrados no exterior das células. Após sua biossíntese, esses polímeros podem ser totalmente liberados no ambiente extracelular ou permanecer envoltos a parede celular formando uma cápsula. Os EPS também são conhecidos por compor o glicocálix formando complexos com outros componentes moleculares não glicídicos localizados na parede celular (SUTHERLAND 1980).

A estrutura polimérica de EPS é representada por longas unidades de açúcares resultando numa massa molecular entre $0,5 \times 10^6$ e 2×10^6 Da. Estes polímeros se associam a uma ampla gama de macromoléculas também de alto peso molecular, como as proteínas, ácidos nucléicos, derivados de ácido urônico, lipídios etc. (FLEMMING, 2010; NICHOLS et al., 2005).

Os EPS são classificados como homopolissacarídeos (HoPS) e heteropolissacarídeos (HePS). Os HoPS são cadeias formadas por apenas um tipo de monossacarídeo e são sintetizados a partir da sacarose através da ação da enzima glicansucrase. São conhecidos como glucanos ou frutanos devido a presença de glicose ou frutose em sua cadeia, como por exemplo: dextrana, uma longa cadeia formada por glicose (MONSAN et al., 2001; BADEL et al., 2011).

Diferente dos HoPS, os HePS são formados por mais de um tipo de monossacarídeos em sua cadeia e apresentam estruturas mais complexas. Sua síntese ocorre com a polimerização de precursores de nucleotídeo de açúcar, como o UDP-glicose e UDP-galactose. Além disso, os HePS podem apresentar grupos fostato e acetil em sua cadeia (DE VUYST et al.,1999; WELMAN & MADDOX, 2003). A estrutura e a ligação dos monossacarídeos que constituem a cadeia polimérica vão determinar suas propriedades químicas e físicas, assim como também suas atividades biológicas (LYNCH et al., 2018). As características de HePS e HoPS e exemplos de estruturas de HoPS estão presentes na tabela 1 e figura 1, respectivamente.

Tabela 1. Características de heteropolissacarídeos (HePS) e homopolissacarídeos (HoPS) de bactérias ácido láticas.

Heteropolissacarídeo	Homopolissacarídeo
Constituído por mais de um tipo de monossacarídeo.	Constituído por um tipo de monossacarídeo.
Geralmente formado por glicose, galactose e ramnose.	Geralmente formado por glicose ou frutose.
Presença de ligação glicosídica α e β.	Presença de ligação glicosídica α e β.
Apresenta cadeia ramificada.	Apresenta cadeia linear ou ramificada.
Massa molecular de 10^4 - 10^6 Da.	Massa molecular >10^6 Da.
Presença de grupos não carboidratos.	Ausência de grupos não carboidratos.

Fonte: (Lynch et al., 2018) adaptado.

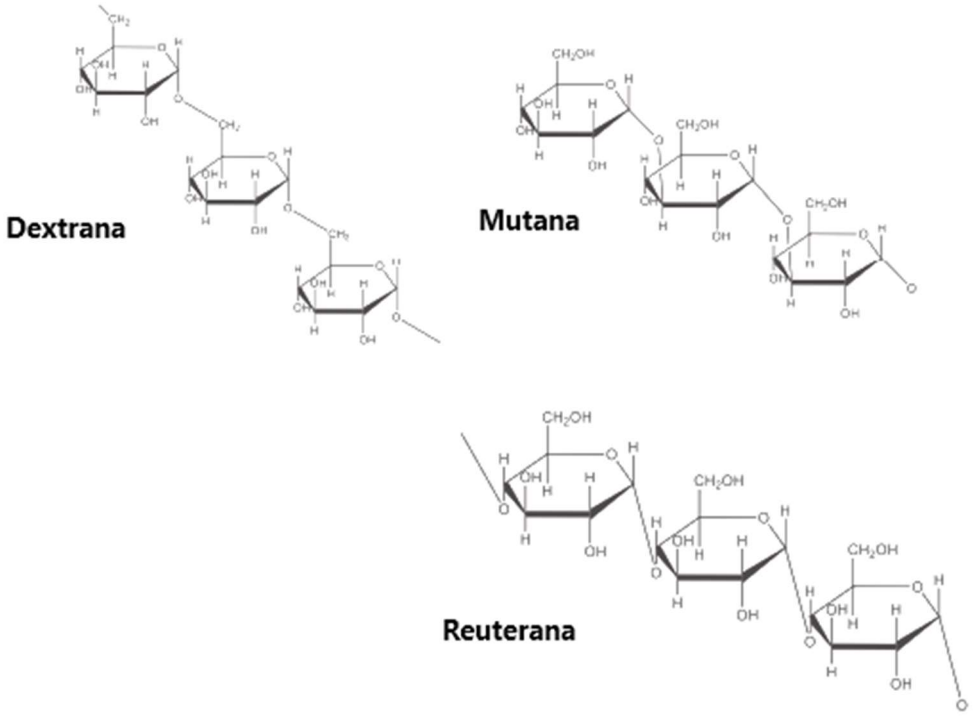


Figura 1. Estrutura química de homopolissacarídeo produzido por bactéria ácido lática.

Fonte: Daba et al. (2021) adaptado.

A variabilidade estrutural e peso molecular de HePS representam grandes diferenças em seu arranjo espacial, rigidez, cargas e capacidade de interagir com outras substâncias como as proteínas, o que torna sua aplicabilidade e rendimento, geralmente diferente de HoPS (DUBOC et al., 2001). Tal variabilidade das características de EPS é um fenômeno geral entre as cepas bacterianas (LOOIJESTEIJN & HUGENHOLTZ, 1999), principalmente as que pertencem ao grupo das bactérias ácido láticas (BAL) como por exemplo a de espécie *Lactococcus Lactis subsp cremosis* LC330 que sintetizou, simultaneamente, dois tipos de EPS com diferentes composições e pesos moleculares (MARSHALL et al., 1995).

2.2 Exopolissacarídeos produzidos por bactérias ácido láticas

Dentre os EPS microbianos, os produzidos por bactérias ácido láticas têm recebido atenção especial devido a sua variabilidade estrutural e aplicabilidade em diversos setores industriais. As bactérias ácido láticas (BAL) formam um grupo diverso de bactérias que se destacam pela produção primária de ácido lático por meio da fermentação de açúcares. São bactérias Gram positivas, catalase negativa, aeróbias facultativas, não esporulantes e se apresentam morfologicamente nas formas de cocos, bacilos e cocobacilos (BROADBENT, 2001). Entre esse grupo, os mais relevantes são os gêneros *Lactobacillus spp*., *Lactococcus spp., Leuconostoc spp., Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp*. (BIOLCATI et al., 2020).

Em relação as propriedades tecnológicas, BAL são classificadas como homofermentativas ou heterofermentativas. As homofermentativas produzem 85 % a mais de ácido lático que outros produtos de fermentação, sendo comumente utilizadas como culturas iniciadoras capazes de promover uma rápida acidificação de produtos alimentares. Já as heterofermentativas são as que formam outros componentes, como: acetato, etanol e dióxido de carbono. Estas estão destinadas a aumentar a qualidade sensorial de alimentos (GATTI et al., 2014, GUARRASI et al., 2017) devido ao intenso metabolismo glicolítico, lipolítico, proteolítico e cetogênico, melhorando o sabor, a textura, o valor nutricional, a prazo de validade e a segurança do alimento (DE SOUZA MOTTA & GOMES, 2015; SOUZA & DIAS, 2017).

Uma variedade de gêneros pertencentes ao grupo das BAL são capazes de sintetizar diferentes classes de EPS desempenhando um papel importante no âmbito

alimentar (DAVE et al., 2016; GASPAR et al., 2003). A função fisiológica da produção de EPS por BAL está diretamente ligada ao papel protetivo. EPS formam uma camada ao redor das células para protegê-las contra condições ambientais adversas, tais como desidratação, temperatura extrema, variação de pH, estresse osmótico, fagocitose, macrófagos e antibióticos. Outro papel do EPS, é a formação de biofilme, mecanismos de adesão celular (DE VUYST 1999; KLEEREBEZEM et al 2010; LOOIJESTEIJN et al., 2001; RUAS-MADIEDO et al., 2002; CAGGIANIELLO et al., 2016).

A aparência do EPS produzido por BAL é muitas vezes descrita como uma substância limosa, viscosa e mucosa, porém nem toda cepa é capaz de produzir EPS com aparência viscosa, no geral ficam envoltas as colônias e apresentam aparência brilhante, como ilustra o exemplo da figura 2 (RUAS-MADIEDO et al., 2005).

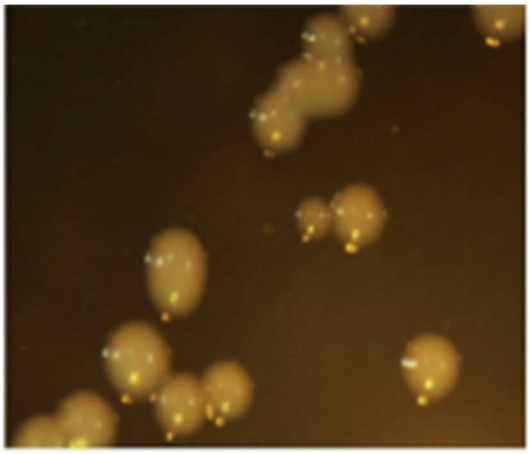


Figura 2. Células de *Enterococcus faecalis* envoltas por substância descrita pelo estudo como cremosa e branca em placar contendo ágar MRS. Fonte: KANSANDEE et al., (2019).

2.3 Propriedades biotecnológicas de exopolissacarídeos produzidos por bactérias ácido láticas

2.3.1 Propriedades tecnológicas

O mercado consumidor tem lidado com uma crescente demanda por novos produtos lácteos, obrigando a indústria de alimentos a buscar novas cepas produtoras de EPS com diferentes propriedades. BAL estãoassociadas ao desenvolvimento de muitos alimentos fermentados, particularmente a base de leite, como coalhada, iogurte, creme de leite, queijo e leite fermentado.Estes alimentos estão presentes na

rotina diária dos consumidores, o que torna importante o aprimoramento não só das caraterísticas sensoriais desses produtos como também das funcionalidades para saúde do consumidor.

Como mencionado anteriormente, a função dos EPS depende muito da forma estrutural do polímero. Tuinier et al. (2001) afirmou em seu estudo que HePS de BAL têm como forte característica a alta viscosidade devido a presença de ligações β-(1,4) que forma uma solução de EPS mais consistente. Seu alto grau deramificação também está diretamente relacionado à rigidez do polímero. Devido a essas características, o papel tecnofuncional de EPS produzido por BAL no setor alimentício está ligado a sua capacidade de atuar como gelificantes, espessantes, emulsificantes, estabilizantes, aglutinantes de água e agentes viscosificantes (DABA et al., 2021).

As BAL produtoras de EPS exercem influência positiva nas características de alimentos, como a textura e detalhes sensoriais (MENDE et al., 2016). Devido ao comportamento pseudoplástico, capacidade de ligação à água e interação com as proteínas do leite, EPS de BAL formam estruturas que promovem o “grosseiro” dos laticínios e melhoram a textura e viscosidade desses produtos. No geral, EPS com alta massa molecular, cadeia rígida e poucas ramificações são responsáveispor uma textura cremosa e alta viscosidade, enquanto os EPS de baixa massa molecular, cadeia flexível e mais ramificada geram produtos mais finos e de baixa viscosidade (GENTÈS et al., 2011).

A propriedade viscosa que os EPS conferem em iogurte se dá pela sua capacidade de interagir com as proteínas do leite. Dependendo da concentração de EPS, ocorre a formação de complexos EPS-EPS ou EPS-proteínas, levando a formação de uma rede polimérica no iogurte, aumentando, assim, a sua viscosidade (LYNCH et al., 2018). Essa interação entre EPS e proteína também favorece no melhoramento de aspectos sensoriais de queijo de baixa gordura. A gordura do leite desempenha um papel importante na estruturação do queijo, pois a membrana que envolve os glóbulos de gordura do leite contém uma superfície hidrofílica para a matriz proteica circundante e atua como um enchimento não interativo, impedindo assim a coalescência completa das proteínas. Como resultado, as poças de soro são distribuídas juntamente com os glóbulos de gordura, facilitando a retirada dessa gordura. A redução do teor de gordura no queijo resulta em um produto mais saudável, com mais proteína e melhor textura (BROADBENT et al., 2001; MOZZI et al., 2006;

AWAD et al., 2005; COSTA et al., 2010).

EPS de LAB também apresentam efeitos positivos quando adicionados em produtos à base de cereais devido a sua capacidade em se ligar com a água e interagir com componentes do glúten ou amido, sendo uma alternativa viável para o cozimento e qualidade de produtos como o pão, por exemplo. No estudo realizado por Di Cagno et al. (2006), o EPS do tipo dextrano foi produzido durante a fermentação da massa azeda de trigo e com isso foi observado o aumento no volume do pão e uma melhor aparência do miolo quando comparado com a produção sem o dextrano. Em outro trabalho realizado por Katina et al. (2009) foi observado um aumento de 10% no volume da massa do pão e de 25-40% na maciez do miolo por meio da produção de dextrano *in situ* pela BAL *Weissella confusa*.

O efeito de EPS, como os dextranos na qualidade do pão, apesar de promissor, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no processo. De modo geral, durante a fermentação da massa, o EPS forma uma rede polimérica com outros componentes (glúten e amido) e a água, melhora a retenção de gás, e assim, aumenta o volume de massa, maciez do miolo e vida útil do alimento (LACAZE et al., 2007; XU et al., 2020).

É importante ressaltar que esse melhoramento na qualidade do pão através da aplicação de EPS traz grandes impactos positivos quando este é aplicado em produtos “glúten free”. O glúten é o ingrediente chave para a estrutura do pão, logo sua ausência na massa resulta num produto que não atende as exigências do consumidor. Produtos sem glúten são caracterizados pela baixa absorção de água, pouco volume na massa e apresentam menor estabilidade. Porém, como relatado anteriormente, a adição de EPS produzido por BAL pode sanar esses problemas encontrados em produtos sem glúten, além de melhorar a qualidade de vida de pessoas acometidas pela doença celíaca — enteropatia autoimune desencadeada pela ingestão de glúten na dieta de indivíduos geneticamente suscetíveis (LYNCH et al., 2018; LEBWOHL et al., 2020). A tabela, a seguir, apresenta alguns exemplos de EPS produzidos por diferentes BAL e suas aplicações.

Tabela 2. Aplicações industriais e funcionais de exopolissacarídeos produzidos por bactérias ácido láticas.

BAL	EPS	Aplicação	Referência

Weissella cibaria	Dextrano	Produção de queijo cheddar e cereais.	Lynch et al., (2014)
Lactobacillus curvatus	Dextrano	Panificação	Pepe et al., (2013)
Streptococcus thermophillus	Ácido hialurônico	Aditivos de cosméticos	Izawa et al., (2009)
Lactobacillus sakei e Leuconostoc mesenteroides	Dextrano	Medicina/confeitaria/ biotecnologia/ alimentos.	Nácher-vázquez et al., (2015) Patel et al., (2013)
Lactobacillus delbrueckii	Levano	Redução do colesterol	Tok et al (2010)
Streptococcus ssp	Levano	Viscosificante/ estabilizante	Patel et al., (2013)
Lactobacillus sanfranciscensi	Levano	Prebiótico	Dal bello et., al (2001)
Lactobacillus paracasei	Glucano	Prebiótico	Stack et al., (2010) Kearney et al., (2011)
Lactobacillus reuteri	Reuteran	Panificação	Sandra et al., (2012)
Lactobacillus sanfranciscensis	Levano	Panificação	Seitter et al., (2020)
Lactobacillus plantarium	Glucano	Panificação	Di cagno et al., (2006)

2.3.2 Propriedades funcionais

Além do potencial tecnológico industrial de alimentos, muitos estudos têm provado que os EPS de LAB também exercem influência na saúde do hospedeiro. Vários estudos relataram sobre os efeitos positivos de associados ao consumo regular de EPS. Dentre os benefícios citados estão os efeitos: anticâncer, antidiabetico, antioxidante, antiviral, antiúlceroso, anticolesterêmico, além das propriedades prebióticas e imunomoduladoras (Figura 3). Tais características contribuem com os benefícios advindos do EPS como ingrediente alimentar (YILDIZ et al., 2018).

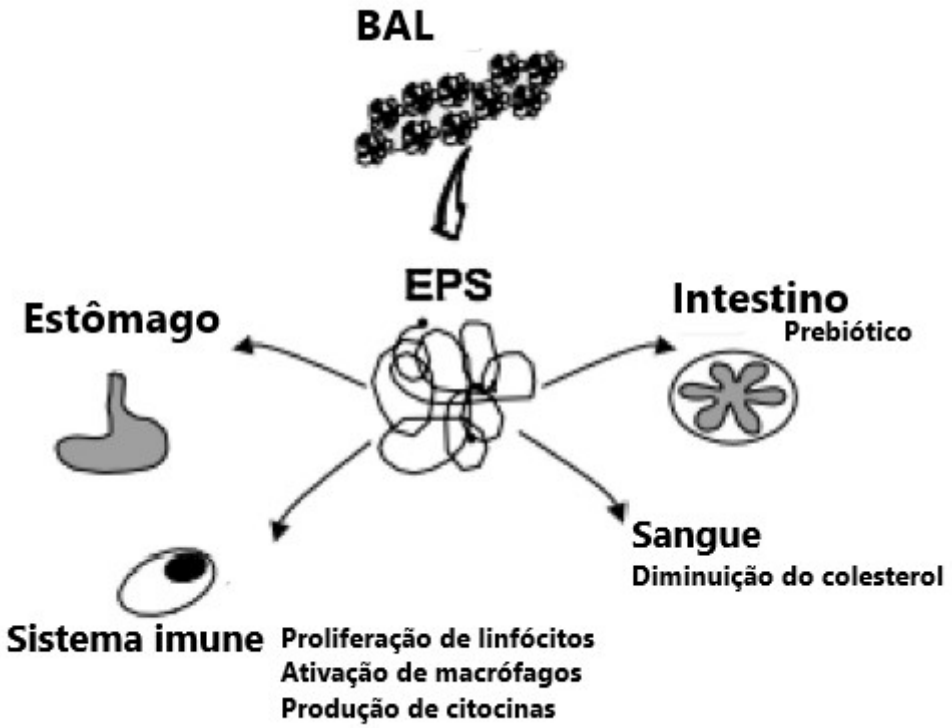


Figura 3. Algumas propriedades biológicas relatadas em estudos com EPS proveniente de bactérias ácido láticas. Fonte: YILDIZ et al. (2018). Adaptado

Estudos realizados por Costa et al. (2017) e Trabelsi et al. (2015) relataram que dextranos são metabolizados por bactérias intestinais potencialmente benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, Por outro lado, não houve metabolização por bactérias potencialmente nocivas, como *Enterobacter* e *Clostridium*, caracterizando o efeito prebiótico do EPS.

A redução de colesterol por EPS de *Limosilactobacillus fermentum* foi observada no estudo realizado por Gawande et al. (2021). Durante a investigação, foi constatado que 2% do EPS foi suficiente para reduzir o teor de colesterol em mais de 90%. Os autores afirmaram que o EPS isolado apresentou melhor desempenho na redução do colesterol do que a própria BAL em condições gastrointestinais. O estudo sugere que o EPS de BAL é um potencial agente hipocolesterolêmico para aplicação em alimentos.

Os EPS microbianos também podem ter efeitos anticancer, como é o caso do estudo feito por Huang et al. (2012), em que demonstraram que EPS de *Trichoderma pseudokoningii* apresentaram impactos em células de leucemia humana K562. Seus achados indicaram que o EPS desencadeia efeitos apoptóticos das células K562.

Embora os estudos dos efeitos anticâncer de EPS sejam escassos, há publicações que indicam a contribuição de produtos extracelulares de BAL como agentes preventivos do câncer colorretal (CALAÇA et al., 2017; ARAGÃO et al., 2021). Além disso, a propriedade antioxidante de EPS de BAL pode ser considerada como via preventiva do desenvolvimento de células cancerígenas (ANDREW et al., 2020).

Vários estudos de atividade antioxidante in vitro utilizando EPS microbiano foram publicados nos últimos dez anos, mas pouco se sabe sobre o mecanismo da capacidade de sequestro de radicais por EPS. Alguns autores sustentam a hipótese de que as características estruturais influenciam fortemente o potencial efeito. De acordo com Andrew et al. (2020), características presentes na estrutura polimérica como: resíduos de monossacarídeos, ramificações, peso molecular, ligação glicosídica, grupos funcionais, proteínas, selênio e modificações químicas provavelmente influenciam sua atividade antioxidante. Isso porque um mesmo EPS pode apresentar desempenho diverso quando testado em diferentes radicais.

Apesar de EPS produzido por BAL apresentarem aplicações diversas ainda há problemas associados ao rendimento, custo de produção e recuperação. HePS, por exemplo, são sintetizadas em pequenas quantidades, limitando-se em miligramas por litro de cultura (RUAS-MADIEDO et al., 2009). O rendimento pode ser afetado por vários fatores, entre eles a composição do meio e o tempo de incubação (DE VUYST & DEGEEST 1999, RUAS-MADIEDO et al. 2009). Por conseguinte, estudos sugerem não só a busca por novas cepas microbianas, como também o estudo de padronização das condições de cultivo do microrganismo para a produção do EPS.

2.4 Produção de exopolissacarídeos por bactérias ácido láticas

A síntese de EPS bacteriano é geralmente favorecida pela presença de uma fonte de carbono em conjunto com a limitação dos demais nutrientes, como por exemplo o nitrogênio e oxigênio (CHAWLA et al., 2009; REHM et al., 2009; KUMAR et al., 2007; BAJAJ et al., 2007). No entanto, o rendimento de produção de EPS depende do microrganismo produtor, pois eles diferem em suas necessidades de nutrição, temperatura, pH, taxa de aeração e condições de fermentação aos quais são submetidos (WILLIAMS et al., 1977). Para alguns EPS é necessária aeração máxima, como é o caso da goma xantana, enquanto para outros, a síntese é maximizada sob condições microaerofílicas, por exemplo, o alginato (REHM et al., 2009).

Na verdade, não existe uma única solução ideal para maximizar os rendimentos

de EPS, afinal, tudo isso depende muito da linhagem da produção de EPS. Segundo Leroy & De Vuyst (2016), uma linhagem bacteriana pode apresentar comportamentos diferentes devido a maneira que tal linhagem absorve os açúcares, que se adapta ao ambiente e aos diferentes nichos, a regulação gênica e atividade enzimática.

No caso das BAL, devido a sua natureza fastidiosa, torna necessária a suplementação de meios com micronutrientes, como carbono adicional, fontes de nitrogênio ou vitaminas (MENDE et al., 2012). Entretanto, a suplementação pode se tornar cara e dispendiosa caso a cepa utilizada não apresente o rendimento esperado. Com isso, o processo de otimização pode vir acompanhado da triagem de cepas produtoras de EPS, afinal alguns microrganismos possuem traços genéticos que são determinantes para obtenção de um bom rendimento (FREITAS et al., 2011).

A triagem para produção de EPS por BAL normalmente envolve o uso de meio de crescimento sólido suplementado. No caso do HoPS, se utiliza, por exemplo, o meio comercial Man Rogosa Sharpe (MRS) e envolve a variação de suplementação com sacarose, frutose ou maltose (DI CAGNO et al., 2006; LYNCH et al., 2014; VAN DER MEULEN et al., 2007). A síntese de HePS está ligada ao crescimento e metabolismo bacteriano, então envolve o uso de meios como leite desnatado reconstituído suplementado com fontes de carbono, como glicose ou lactose (MENDE et al., 2012; MOZZI et al., 2006). Em estudo realizado por Gamar et al. (1997) foi relatado que a produção e rendimento de EPS foram influenciados pela fonte de carbono e concentração. *Lactobacillus rhamnosus* quando cultivado em meio contendo manose (4 %, p/v) ou glicose + frutose a (2 %, 1:1) observou-se um aumento de três a quatro vezes no rendimento de produção de EPS considerando que as concentrações finais de biomassa foram idênticas. Em outro trabalho realizado por Yuksekdag et al. (2008) constataram que as cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp, bulgaricus* e *Streptoccocus thermophillus* foram capazes de produzir EPS na presença de vários açúcares, sendo a glicose a fonte mais eficiente.

Do ponto de vista fisiológico, a seleção da cepa e da fonte de carbono adequada para produção de EPS é importante porque há processos de regulação (transporte de açúcar e síntese de precursores enzimáticos) que podem estar sob repressão catabólica (BOELS et al., 2001; LAWS et al., 2001).

Estudos realizados por Cerning et al., (1994) e Mozzi et al. (2001) mostraram que cepas da mesma espécie (*Lb.casei*) tiveram resultados diferentes quando testadas em fontes de carbono em comum. No primeiro trabalho, o rendimento de

EPS foi maior em meio suplementado com glicose do que o suplementado com lactose ou galactose. Já no segundo trabalho, houve divergência, o rendimento de EPS foi maior em meio contendo galactose do que glicose. Segundo Ruas-madiedo et al. (2005), essa contradição ocorre devido a variação da atividade das enzimas envolvidas na síntese de açúcar-nucleotídeos, precursores das unidades de repetição que constroem HePS. Essa condição fisiológica abre possibilidades de optar por meios de produção de baixo custo, uma vez que meio de cultivo comercial representa, em média, 30% do custo total de processos fermentativos (FREITAS et al., 2011), o que torna indispensável optar por fontes de carbono obtidas através de resíduos agroindustriais, como o soro de queijo, pasta de tomate, polpa de frutas, cana-de-açúcar (ANTUNES et al., 2015, 2017; MEHTA et al., 2014; BAJAJ et al., 2007). Porém, na literatura ainda há poucos estudos envolvendo a produção de EPS por BAL em meio alternativo de baixo custo. Alguns trabalhos recentes têm utilizado soro de queijo (LI et al., 2020), água de coco (GOVEAS et al., 2021) e fécula de mandioca (SOUMYA et al., 2019).

2.5 Soro de leite como via fermentativa de bactérias ácido láticas para produção de exopolissacarídeos.

O soro de leite é um subproduto resultante da produção de queijo ou coagulação da caseína do leite. Sua cor normalmente é amarela-esverdeada podendo variar a tonalidade a depender do tipo de leite utilizado. O soro pode ser obtido de vários tipos de leite, porém o de vaca é normalmente mais utilizado em países ocidentais, enquanto algumas regiões do mundo se utilizam leite de cabra, ovelha e camelo na produção de queijo (BORDENAVE-JUCHEREAU et al., 2005; SMITHERS, 2008).

A composição está diretamente relacionada com o processamento e técnicas para remoção da caseína do leite. A coagulação da caseína ocorre em faixa de pH 6,5 que vai gerar a liberação de soro de leite doce, mas quando o processo de coagulação ocorre através da adição de ácidos (minerais ou orgânicos) é gerado o soro de leite ácido em que o pH fica em torno de 5,0 (JELEN et al., 2003; KOSSEVA et al., 2009).

Ao final da coagulação da caseína, é produzido um efluente rico em nutrientes do leite, como: lactose, proteínas solúveis, minerais e gordura. Além disso, também

há presença de outros componentes como o ácido cítrico,compostos nitrogenados não proteicos (ureia, ácido úrico), vitaminas do grupo B, etc (GARCÍA BILBAO, 1981; WIERZBICKI, 1973; PANESAR *et al.,* 2007). Os principais componentes podem ser vistos na tabela 3 junto as respectivas concentrações, de acordo com Lappa et al. (2019).

As proteínas β-lactoglobulina, α-Lactoglobulina, imunoglobulinas, albumina sérica e lactoferrina também são encontrados na composição do soro de queijo (CASAL et al., 2006). Essas características nutricionais e médicas de concentrados de proteínas despertou o interesse em transformar o soro de leite em produtos de valor agregado.

Tabela 3. Concentração média dos principais componentes presentes no soro de leite de vaca.

Composição	Concentração (p/v)
Lactose	4,6%
Proteínas	1,2%
Cinzas	0,6%
Sólidos totais	5-8%
Gordura	0,3%
Água	92,7%

Segundo a FAO (Organização Alimentar e Agrícola), o queijo é um dos principais produtos agrícolas do mundo. No Nordeste, esse subproduto é de grande relevância, afinal o queijo de coalho é um produto tipicamente tradicional que compõe aspectos socioeconômicos e nutricionais daregião (FONTENELE et al., 2017; SOARES et al., 2017). Contudo, qualquer que seja o tipo de queijo (coalho, parmesão, muçarela, gouda, azul dinamarquês, brie, etc), sua produção gera um grande volume de efluente que representa um significativo impacto ambiental (GHALY E SINGH, 1989; COMEAU et al., 1996; SISO, 1996; BERRUGA et al., 1997; LEE et al., 2003). O despejo do soro de queijo, sem o devido tratamento, pode afetar as características físico-químicas do solo e corpos d'água por possuir baixa degradabilidade e reduzir a disponibilidade de oxigênio dissolvido, causando grande risco para o meio ambiente e vida aquática (GHALY et al., 2007).

Estima-se que a produção global de soro de leite gira em torno de 145 milhões de toneladas por ano (MACWAN et al., 2016). Desse total, cerca de 50% são utilizados para produção de alguns produtos de valor, como o soro de queijo em pó, queijo ricota e proteínas isoladas (MOLLEA et al., 2013). O restante é descartado como efluente ou usados para alimentação animal.

Felizmente, técnicas de bioprocessos foram desenvolvidas para utilizar as sobras de soro de leite de forma efetiva, ou seja, sua bioconversão em produtos voltados para a indústria. Tais processos utilizam via microbiana para conversão da lactose presente no soro de leite em ácidos orgânicos, bioálcoois, gases de efeito estufa (hidrogênio, metano) e bioplásticos (PRAZERES et al., 2012; YADAV et al., 2015; LAPPA et al., 2019).

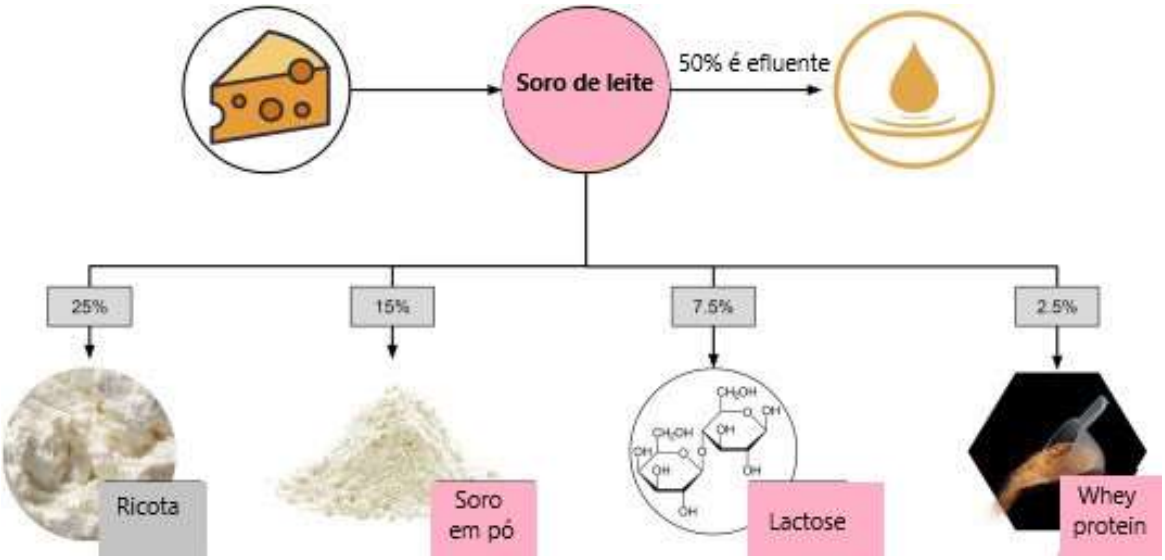


Figura 4. Algumas aplicações para o reaproveitamento do soro de leite de acordo com Mollea et al., (2019). Adaptado (RAMA et al., 2019).

Vários estudos também utilizam soro de leite para o viés biotecnológico e alimentar, como por exemplo a produção de enzima lactase (DA SILVA et al., 2015; BOSSO et al., 2019), aplicação em espessantes (FANG et al., 2019), produção de bioetanol microbiano (MURARI et al., 2019), produção de hidrogênio (RAMOS et al., 2018) e substrato para crescimento de bactérias probióticas (KRUNIĆ et al., 2019).

O soro de leite tem sido utilizado como substrato alternativo para crescimento de BAL e produção de bioativos de valor agregado. Tal procedimento contribui com a

redução dos custos de produção, com a sustentabilidade ambiental e com a simplificação dos processos. BAL como *Lb casei, Lb helveticus, Lb acidophillus* e espécies do gênero *Streptococcus*, por exemplo, são conhecidas pela produção de ácido lático via fermentação da lactose presente no soro de leite (KIM et al., 2006; SORIANO-PEREZ et al., 2012; AMIRIN et al., 2020).

Meios de cultura a base de soro para crescimento de BAL são em geral pré tratados, a exemplo do permeado de soro de leite suplementado com extrato de levedura ou peptona para crescimento de *Lb helveticus* (SORIANO PEREZ et al., 2012). Também tem o soro nas versões ultrafiltrado e suplementado com meio comercial utilizados para aumentar o rendimento da biomassa de BAL como o *Lb. casei* (ALVAREZ et al., 2010; BURNS et al., 2008). Os autores constataram que o soro sem tratamento (não suplementado) apresenta cinética de crescimento bacteriano em torno de 1 log menor comparado aos tratados. Porém, Rama et al. (2019) reforçaram de que a necessidade de suplementação dependente da cepa utilizada.

O aumento da utilização de soro de leite como via alternativa em setores alimentícios e biotecnológico se justifica não pelo aporte nutricional, mas também por ser um resíduo que tem se mostrado flexível e adaptável aos processos. Sendo assim, meio de cultura a base de soro de leite substitui com eficiência e baixo custo, podendo inclusive melhorar o rendimento de muitas moléculas de valor a partir de estudos de delineamento experimental, como mencionado acima.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Produzir, otimizar e caracterizar exopolissacarídeos de bactéria ácido lática utilizando soro de leite como substrato fermentativo e avaliar o potencial antioxidante.

3.2 Específicos

- Caracterizar o soro de leite quanto a acidez, teor de proteína e de lactose, pH e cinzas;
- Selecionar BAL isoladas a partir do queijo de coalho artesanal para a produção de EPS por meio da fermentação do soro de queijo;
- Identificar BAL selecionada por meio de métodos moleculares;
- Otimizar os parâmetros de produção de EPS por meio de delineamento experimental estatístico;
- Caracterizar parcialmente o EPS quanto a composição estrutural; e
- Determinar o potencial biotecnológico EPS através de ensaios *in vitro* da ação antioxidante contra os radicais DPPH, ABTS, hidroxila e superóxido.

4. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M. M. et al. Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of Lactobacillus casei var. rhamnosus in milk whey. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5552-5560, 2010.

ANDREW, Monic; JAYARAMAN, Gurunathan. Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. **Carbohydrate research**, v. 487, p. 107881, 2020.

AMIRI, Saber et al. In situ production of conjugated linoleic acid by Bifidobacterium lactis BB12 and Lactobacillus acidophilus LA5 in milk model medium. **LWT**, v. 132, p. 109933, 2020.

ANTUNES, Sílvia et al. Conversion of cheese whey into a fucose-and glucuronic acid-rich extracellular polysaccharide by Enterobacter A47. **Journal of biotechnology**, v. 210, p. 1-7, 2015.

ARAGÃO, Ana Beatriz Lins et al. EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL: UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 2, n. 5, p. e25318-e25318, 2021.

AWAD, S.; HASSAN, A. N.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced-fat Cheddar cheese: Texture and melting properties. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4204-4213, 2005.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, Philippe. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides**. Biotechnology advances**, v. 29, n. 1, p. 54-66, 2011.

BAJAJ, Ishwar B. et al. Gellan gum: fermentative production, downstream processing, and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 341-354, 2007.

BAJPAI, Vivek K. et al. Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality, and prospects. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 1-23, 2016.

BARUAH, R.; DAS, D.; GOYAL, A. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria: current trends and applications. **Journal of Probiotic and Health**, v. 4, n. 141, p. 2, 2016.

BERRUGA, M. I.; JASPE, A.; SANJOSE, C. Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. **International biodeterioration & biodegradation**,v. 40, n. 2-4, p. 119-123, 1997.

BILBAO, JL García. Aprovechamiento del suero de leche desproteinizado y de materiales nitrogenados de desecho por algunas levaduras. **Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos**, n. 119, p. 65-69, 1981.

BIOLCATI, Federica et al. Microbial characterization of an artisanal production of Robiola di Roccaverano cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, p. 4056-4067, 2020.

BOELS, Ingeborg C. et al. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 723-732, 2001.

BOSSO, Alessandra et al. Substrate consumption and beta-galactosidase production by Saccharomyces fragilis IZ 275 grown in cheese whey as a function of cell growth rate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101335, 2019

BROADBENT, Jeffery R. et al. Genetics of lactic acid bacteria. Food Science and Technology-new york-marcel dekker-, p. 243-300, 2001.

BORDENAVE-JUCHEREAU, Stéphanie et al. Effect of protein concentration, pH, lactose content and pasteurization on thermal gelation of acid caprine whey protein concentrates. **Journal of dairy research**, v. 72, n. 1, p. 34-38, 2005.

BURNS, P. et al. Probiotic Crescenza cheese containing Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus manufactured with high-pressure homogenized milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 500-512, 2008.

CALAÇA, Priscilla RA et al. Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão da literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 587-592, 2017.

CARVALHO, Fátima; PRAZERES, Ana R.; RIVAS, Javier. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the total environment**, v. 445,p. 385-396, 2013.

CERNING, J. C. M. C. et al. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by Lactobacillus casei CG11 and partial structure analysis of the polymer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 3914-3919, 1994.

CHAWLA, Prashant R. et al. Microbial cellulose: fermentative production and applications. **Food Technology & Biotechnology**, v. 47, n. 2, 2009.

CASAL, Enriqueta et al. Use of chitosan for selective removal of β- lactoglobulin from whey. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1384-1389, 2006.

COMEAU, Yves et al. Biological nutrient removal from a phosphorus-rich pre-fermented industrial wastewater. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 1-2, p. 169-177, 1996.

COSTA, N. E. et al. Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of Lactococcus lactis on half-fat Cheddar cheese. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 8, p. 3469-3486, 2010.

CAGGIANIELLO, Graziano; KLEEREBEZEM, Michiel; SPANO, Giuseppe. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3877-3886, 2016.

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

DA COSTA, Guilherme Mamede et al. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on L. paracasei viability, physicochemical characteristics, and acceptance of probiotic orange juice. **LWT**, v. 75, p. 195-201, 2017.

DAL BELLO, Fabio et al. *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. **Systematic and applied microbiology**, v. 24, n. 2, p. 232-237, 2001.

DAUFIN, Georges; RENÉ, Frédéric; AIMAR, Pierre. Séparations par membrane dans les procedes de **l'industrie alimentaire**. Lavoisier Tec & Doc, 1998.

DAVE, S. R. et al. Microbial exopolysaccharide-an inevitable product for living beings and environment. **Journal of Bacteriology and Mycology** Open Access, v. 2, n. 4, p. 109-111,2016.

DE SOUZA, Jane Viana; DIAS, Francesca Silva. Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. Current Opinion in **Food Science**, v. 13, p. 1-9, 2017.

MOTTA, Amanda De Souza; GOMES, Melina Da Silva Mesquita. TECHNOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA: THE IMPORTANCE OF THESE MICROORGANISMS FOR FOOD. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 172, 2015.

DE VUYST, Luc; DEGEEST, Bart. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 153-177, 1999.

DI CAGNO, Raffaella et al. Glucan and fructan production by sourdough Weissella cibaria and Lactobacillus plantarum. Journal of Agricultural and Food chemistry, v. 54, n. 26, p. 9873-9881, 2006.

DUBOC, Philippe; MOLLET, Beat. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 759-768, 2001.

FANG, Tianqi; GUO, Mingruo. Physicochemical, texture properties, and microstructure of yogurt using polymerized whey protein directly prepared from cheese whey as a thickening agent. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 9, p. 7884- 7894, 2019.

FLEMMING, Hans-Curt ; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676145>. Acesso em: 10 jun. 2019.

FONTENELE, Maria A. et al. Peptide profile of Coalho cheese: A contribution for Protected Designation of Origin (PDO). **Food chemistry**, v. 219, p. 382-390, 2017.

FREITAS, Filomena; ALVES, Vitor D.; REIS, Maria AM. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388-398, 2011.

GAMAR, L.; BLONDEAU, K.; SIMONET, J.-M. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by Lactobacillus rhamnosus strain C83. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 281-287, 1997.

GASPAR, Paula et al. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 6, p. 764-788, 2013.

GATTI, Monica et al. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long- ripened cheeses produced using undefined natural whey starters**. Journal of dairy science**, v. 97, n. 2, p. 573-591, 2014.

GAWANDE, Krushna et al. Lactic acid bacteria based purified exopolysaccharide showed viscofying and hypercholesterolemic capabilites. **Food Hydrocolloids for Health**, v. 1, p. 100042, 2021.

GENTÈS, Marie-Claude; ST-GELAIS, Daniel; TURGEON, Sylvie L. Gel formation and rheological properties of fermented milk within situ exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. **Dairy science & technology**, v. 91, n. 5, p. 645-661, 2011.

GOVEAS, Louella Concepta et al. Development of coconut water-based exopolysaccharide rich functional beverage by fermentation with probiotic Lactobacillus plantarum SVP2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102030, 2021.

GHALY, A. E.; SINGH, R. K. Pollution potential reduction of cheese whey through yeast fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 181-203, 1989.

GHALY, Abdel E. et al. Potential environmental and health impacts of high land application of cheese whey. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 2, p. 106-117, 2007.

GUARRASI, Valeria et al. The individual contribution of starter and non-starter lactic acid bacteria to the volatile organic compound composition of Caciocavallo Palermitano cheese. **International journal of food microbiology**, v. 259, p. 35-42, 2017.

HUANG, Taotao et al. An exopolysaccharide from Trichoderma pseudokoningii and its apoptotic activity on human leukemia K562 cells. **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 2, p. 701-708, 2012.

IZAWA, Naoki et al. Streptococcus thermophilus produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 119-123, 2009.

JELEN, Paul; TOSSAVAINEN, Olli. Low lactose and lactose-free milk and dairy products-prospects, technologies, and applications. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 2, p. 161, 2003.

KATINA, Kati et al. In situ production and analysis of Weissella confusa dextran in wheat sourdough**. Food microbiology**, v. 26, n. 7, p. 734-743, 2009.

KEARNEY, Niamh et al. Lactobacillus paracasei NFBC 338 producing recombinant beta-glucan positively influences the functional properties ofyoghurt**. International Dairy Journa**l, v. 21, n. 8, p. 561-567, 2011.

KLEEREBEZEM, Michiel et al. The extracellular biology of the lactobacilli. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. 199-230, 2010.

KOSSEVA, Maria R. et al. Use of immobilised biocatalysts in the processing ofcheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 437- 447, 2009.

KIM, Hyang-Ok et al. Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of Lactobacillus sp. RKY2. In: **Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, 2006. p. 694-704.

KRUNIĆ, Tanja Ž.; OBRADOVIĆ, Nataša S.; RAKIN, Marica B. Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein-based carrier for probiotic starter culture**. Food Chemistry**, v. 293, p. 74-82, 2019.

WIERZBICKI, L. E.; KOSIKOWSKI, F. V. Lactase potential of various microorganisms grown in whey**. Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 1, p. 26-32, 1973.

LACAZE, G.; WICK, M.; CAPPELLE, S. Emerging fermentation technologies: development of novel sourdoughs. **Food Microbiology,** v. 24, n. 2, p. 155-160, 2007.

LAPPA, Iliada K. et al. Cheese whey processing: Integrated biorefinery concepts and emerging food applications. **Foods**, v. 8, n. 8, p. 347, 2019.

LAWS, Andrew; GU, Yucheng; MARSHALL, Valerie. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology advances**, v. 19, n. 8, p. 597-625, 2001.

LEBWOHL, Benjamin et al. Association between celiac disease and mortality risk in a Swedish population. **Jama**, v. 323, n. 13, p. 1277-1285, 2020.

LEE, Hwanyoung et al. Production of Ganoderma lucidum mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics. **Biochemical engineering journal**, v. 15, n. 2, p. 93-99, 2003

LEIGH, John A.; COPLIN, David L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. **Annual review of microbiology**, v. 46, n. 1, p. 307-346, 1992.

LEROY, Frédéric; DE VUYST, Luc. Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 4, p. 3229-3238, 2016.

LI, Chengcheng et al. Bioconversion of cheese whey into a heteropolysaccharide via a one-step bioprocess and its applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107701, 2020.

LOOIJESTEIJN, Petronella J. et al. Physiological function of exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis. **International journal of food microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 71-80, 2001.

LYNCH, Kieran M. et al. Isolation and characterisation of exopolysaccharide producing Weissella and Lactobacillus and their application as adjunct cultures in Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 1, p. 125-134, 2014.

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

Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Parmar, S., & Aparnathi, K. (2016). Whey and its utilization. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 5, 134–155

MARSHALL, Valerie M.; COWIE, Eoin N.; MORETON, Rod S. Analysis, and production of two exopolysaccharides from Lactococcus lactis subsp. cremoris LC330. **Journal of Dairy Research**, v. 62, n. 4, p. 621-628, 1995.

MEHTA, Ananya; PRASAD, G. S.; CHOUDHURY, Anirban Roy. Cost effective production of pullulan from agri-industrial residues using response surface methodology. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, p. 252-256, 2014.

MENDE, Susann et al. Impact of polysaccharides from lactic acid bacteria on the rheological behaviour of acid milk gels. **Annual Transaction Nordic Rheology Society**, v. 20, p. 153-157, 2012.

MENDE, Susann; ROHM, Harald; JAROS, Doris. Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. **International Dairy Journal**, v. 52, p. 57-71, 2016.

MOLLEA, Chiara; MARMO, Luca; BOSCO, Francesca. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: **Food industry**. IntechOpen, 2013.

MONSAN, Pierre et al. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 675-685, 2001.

MORIN, A. Screening of polysaccharide-producing microorganisms, factorsinfluencing the production and recovery of microbial polysaccharides. Polysaccharides–Structural Diversity and Functional Versatility. Dumitriu, S. (Ed.), Marcel Dekker Inc. Publication, New York, p. 275-296, 1998.

MOZZI, F. et al. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in Lactobacillus casei CRL 87. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 160-167, 2001.

MOZZI, Fernanda et al. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4431-4435, 2006.

MURARI, Cleidiane Samara et al. Optimization of bioethanol production from cheese whey using Kluyveromyces marxianus URM 7404. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101182, 2019.

NÁCHER-VÁZQUEZ, Montserrat et al. Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 292-301, 2015.

NICHOLS, C. A.; GUEZENNEC, Jean; BOWMAN, J. P. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the Southern Ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. **Marine biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 253-271, 2005.

PATEL, Ami; PRAJAPAT, J. B. Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Advances in Dairy Research**, p. 1-8, 2013.

PANESAR, Parmjit S. et al. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food chemistry**, v. 105, n. 1, p. 1-14, 2007.

PEPE, Olimpia et al. Prebiotic content of bread prepared with flour from immature wheat grain and selected dextran-producing lactic acid bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3779-3785, 2013.

POTYSZ, Anna et al. Bacterially mediated weathering of crystalline and amorphous Cu-slags. **Applied Geochemistry**, v. 64, p. 92-106, 2016.

REHM, Bernd. Microbial production of biopolymers and polymer precursors. **Caister Academic**, 2009.

PRAZERES, Ana R.; CARVALHO, Fátima; RIVAS, Javier. Cheese whey management: A review. **Journal of environmental management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

RAMA, Gabriela Rabaioli et al. Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. **International Dairy Journal**, v. 98, p. 25-37, 2019.

RUAS-MADIEDO, Patricia; HUGENHOLTZ, Jeroen; ZOON, Pieternela. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International dairy journal**, v. 12, n. 2-3, p. 163-171, 2002.

RUAS-MADIEDO, Patricia; DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 3, p. 843-856, 2005.

RUAS-MADIEDO, Patricia et al. Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by Bifidobacterium animalis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1204-1207, 2009.

SANDRA, Galle et al. Comparison of the impact of dextran and reuteran onthe quality of wheat sourdough bread. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 3, p. 531- 537, 2012.

SEITTER, Michael et al. Effect of exopolysaccharides produced by Lactobacillus sanfranciscensis on the processing properties of wheatdoughs. European **Food Research and Technology**, v. 246, n. 3, p. 461-469, 2020.

SHUKLA, Arpit et al. Depicting the exemplary knowledge of microbial exopolysaccharides in a nutshell. **European Polymer Journal**, v. 119, p. 298-310, 2019.

SHUKLA, Arpit et al. Depicting the exemplary knowledge of microbial exopolysaccharides in a nutshell. **European Polymer Journal**, v. 119, p. 298-310, 2019.

SMITHERS, Geoffrey W. Whey and whey proteins from gutter-to-gold**. International dairy journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008.

SOARES, Eveline KB et al. What are the cultural effects on consumers' perceptions? A case study covering coalho cheese in the Brazilian northeast and southeast area using word association. **Food research international**, v. 102, p. 553- 558, 2017.

SOUMYA, M. P. et al. Cassava starch hydrolysate as sustainable carbon source for exopolysaccharide production by Lactobacillus plantarum. **Bioresource Technology Reports**, v. 6, p. 85-88, 2019.

SORIANO-PEREZ, Sonia et al. Production of lactic acid from cheese whey by batch cultures of Lactobacillus helveticus. **Annals of microbiology**, v. 62, n. 1, p. 313-317, 2012.

SISO, MI González. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource technology**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996.

STACK, Helena M. et al. Association of beta-glucan endogenous production with

increased stress tolerance of intestinal lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 500-507, 2010.

SURESH KUMAR, Anita; MODY, Kalpana; JHA, Bhavanath. Bacterial exopolysaccharides–a perception. **Journal of basic microbiology**, v. 47, n. 2, p. 103-117, 2007.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides **Annual Revew of Microbiology,** v. 34, p. 79-150, 1980.

TOK, ESRA; ASLIM, BELMA. Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. **Microbiology and immunology**, v. 54, n. 5, p. 257-264, 2010.

TRABELSI, Imen et al. 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.

TUINIER, R. et al. Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from Lactococcus lactis. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 59, n. 3, p. 160-166, 2001.

ULLRICH, Matthias (Ed.). Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends. **Horizon Scientific Press**, 2009.

VENDRAMIN, Veronica et al. Genome comparison and physiological characterization of eight Streptococcus thermophilus strains isolated from Italian dairy products. **Food microbiology**, v. 63, p. 47-57, 2017.

WELMAN, Alan D.; MADDOX, Ian S. Exopolysaccharides from lactic acidbacteria: perspectives and challenges. **Trends in biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 269- 274, 2003.

WILLIAMS, A. G.; WIMPENNY, J. W. T. Exopolysaccharide Production by Pseudomonasncib11264 Grown in Batch Culture. **Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 13-21, 1977.

VAN DER MEULEN, Roel et al. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. **International journal of food microbiology**, v. 118, n. 3, p. 250-258, 2007.

VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. **Bebidas não alcoólicas: ciência e tecnologia**. Editora Blucher, 2010.

XU, Xiaoqing et al. A novel exopolysaccharide produced by Lactobacilluscoryniformis NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties *in vitro*. **Food& nutrition research**, v. 64, 2020.

YADAV, Jay Shankar Singh et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology**

advances, v. 33, n. 6, p. 756-774, 2015.

YILDIZ, Hilal; KARATAS, Neva. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 41-46, 2018.

YUKSEKDAG, Zehra Nur; ASLIM, Belma. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus (B3, G12) and Streptococcus thermophilus (W22). **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 581-585, 2008.

CAPÍTULO 1

Bioconversão de soro de queijo residual em exopolissacarídeo através da fermentação de bactérias ácido láticas e avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

Elaine Cristina da Silva[1], Leandro Paes de Brito[2], Francisca Crislândia Oliveira Silva[3], Dayane da Silva Santos[4], Raquel Pedrosa Bezerra[1], Paulo Antônio Galindo Soares[3], Marcos Antônio de Morais Junior[4], Ana Lúcia Figueiredo Porto[1], Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares[1]*

[1]Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife – PE 52171-900.
Brasil.

[2]Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – PE 50670-901, Brasil.

[3]Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – PE 50670-901, Brasil.

[4]Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – PE 50670-901, Brasil.

* Autor correspondente E-mail: mtcvsoares@yahoo.com.br

RESUMO

O soro de queijo é um resíduo altamente tóxico para o meio ambiente devido à alta demanda de nutrientes em sua composição. Por ser obtido da fabricação de queijo, grande quantidade de lactose e outros componentes essenciais presentes no leite de vaca permanecem no soro. Por esse motivo, o objetivo do presente estudo foi reaproveitar o soro de queijo como substrato para fermentação de bactérias ácido láticas e produção de exopolissacarídeos (EPS), e, a partir disso, avaliar as propriedades antioxidantes in vitro. Um total de 64 cepas de bactérias ácido láticas isoladas de queijo de coalho foram testadas para seleção da melhor produtora de EPS. Após seleção, a cepa foi identificada por métodos moleculares. A influência da temperatura, pH e tempo de fermentação foi avaliada para determinar as condições ótimas para produção de EPS em meio soro de queijo. O EPS obtido também foi parcialmente caracterizado e avaliado em concentrações de 0,2 a 2 mg/mL quanto ao efeito antioxidante, contra os radicais DPPH, ABTS, hidroxila e superóxido. Como resultados, a cepa (133v) selecionada apresentou concentração de 5,58 mg/mL e após teste de genotipagem, foi constatado que se trata da bactéria de espécie *Enterococcus faecium*. Com isso, o EPS foi denominado EPS133V. A partir do delineamento experimental estatístico, foi possível obter 21,74 mg/mL de EPS133v em condições otimizadas, tais quais, o pH foi fixado em 6, temperatura e tempo de fermentação apresentaram níveis ótimos em 42 °C e 22 h respectivamente. Em sua composição, foi observado características típicas de carboidratos, como a presença de grupos hidroxila, amina, carboxila, proteínas e ácido urônico. Nos ensaios de atividade antioxidante, o EPS apresentou potencial, em todas as concentrações, de redução do radical DPPH, ABTS e superóxido com capacidade máxima de 27%, 72,20% e 43,23%, respectivamente. O radical hidroxila só apresentou atividade antioxidante a partir da concentração de 2 mg/mL com 1,29 %. Em conclusão, este estudo mostrou que foi possível obter um biopolímero natural com potencial aplicação na indústria alimentícia através da fermentação de meio de baixo custo, nutricionalmente rico e abundante.

Palavras-chave: Meio de baixo custo; otimização; propriedades biológicas; carboidratos.

1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo é um subproduto de alto valor, obtido através da coagulação das caseínas presentes no leite durante a fabricação de queijo. Devido ao grande aporte de matéria orgânica (lactose, proteínas e lipídios) e de suas características físico-químicas, o soro de queijo é considerado como efluente abundante e extremamente poluente (PRAZERES et al., 2012; MOLLEA et al., 2013; ERGUDER et al., 2001).

De acordo com o Statista, portal de dados de mercado e consumidor, em 2020, a produção global de queijo atingiu a marca de 21,69 milhões de toneladas. Essa estatística tem avançado com os dados de consumo de queijo que marcaram, em 2021, 9,1 milhões de toneladas só na União Europeia. O crescente consumo de queijo pode acarretar numa maior geração de subprodutos obtidos das produções de queijos em todo mundo. Estima-se que para a produção de 1kg de queijo é gerado 9 litros de soro. (PRAZERES et a., 2012)

Como um importante subproduto lácteo, o despejo do soro de queijo necessita de tratamento prévio, do contrário, pode causar impactos negativos no meio ambiente devido à alta demanda de componentes orgânicos (MOLLEA et al., 2013; GHALY et al., 2007). Para sanar esses problemas, o seu reaproveitamento tem se mostrado uma via eficaz e muitas vezes benéfica do ponto de vista econômico.

Alguns trabalhos têm demonstrado tratamentos biológicos utilizando soro de leite, em que ocorre a sua conversão em produtos de valor agregado (YADAV et al., 2015; LI et al., 2020; DE CARVALHO et a., 2020; DA SILVA et a., 2015). Com a presença de lactose na composição, o soro de queijo pode ser um ótimo aliado como substrato para fermentação microbiana, inclusive para a formação de novos açúcares de interesse industrial, como os exopolissacarídeos.

Exopolissacarideos, ou EPS são estruturas poliméricas formadas por monossacarídeos e encontrados no exterior das células (SANLIBABA et al., 2016; KORCZ & VARGA 2018). Os EPS secretados por Bactérias Ácido Láticas (BAL) – grande grupo de bactérias conhecidas

pela produção majoritária de ácido lático – são de grande valia, uma vez que desempenham um papel importante nas características reológicas e sensoriais de laticínios, em razão das propriedades viscoelásticas e afinidade com a água que melhoram a textura e o sabor de alimentos (LYNCH et al., 2018). Além disso, EPS microbianos apresentam efeitos biológicos na saúde humana. Estudos revelaram propriedades prebióticas, anticolesterolêmica, antitumorais, antivírus, anticoagulantes e antioxidantes (RODRIGUEZ et al., 2008; NAGAOKA et al., 1994; NAKAIIMA et al., 1992; TOK & SLIM 2010; ZHOU et al., 2019).

Muitas cepas de BAL produzem uma grande variedade de EPS com diferentes características físico-quimicas. Essas diferenças são determinantes para aplicação biotecnológica do biopolímero (CERNING et al., 1999; PRETE et al., 2021). Porém, a produção e rendimento de EPS de BAL são desafiantes, pois grande parte dos custos de processamento provém do substrato de crescimento bacteriano, o que torna o processo caro e dispendioso. Embora sejam consideradas bactérias fastidiosas, as BAL possuem a vantagem de utilizar fontes de carbono para a biossíntese de vários produtos, inclusive de EPS (PATEL et al., 2012; XU et al., 2012; LYNCH et al., 2018). Desse modo, a lactose presente na composição do soro pode ser uma fonte de carbono alternativa de baixo custo para fermentação de BAL e produção de EPS.

Considerando o aumento anual do consumo de queijo e o consequente aumento de geração do efluente, este trabalho teve por objetivo o reaproveitamento do soro de queijo de coalho como substrato para fermentação e produção de EPS por BAL, assim como, o estudo estatístico para determinar as melhores condições de produção e avaliação do potencial antioxidante do novo biopolímero para possível aplicação no setor de alimentos lácteos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e preparo do meio de cultura

Um total de 64 amostras de BAL de gêneros *Lactobacillus, Enterococcus,*

Streptococcus e *Lactococcus* isolados de queijo de coalho, produzidos nas regiões Agreste e Sertão de Pernambuco (Capoeiras, Venturosa e a Arcoverde), foram fornecidas pelo Laboratório de produtos bioativos (LABTECBIO) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. Todos os isolados foram submetidos a procedimentos preliminares de identificação bioquímica e fenotípica descritos por Argyri et al. (2013) e mantidos a -80°C em frascos estéreis contendo leite desnatado a 12% (p/v) e 20% (v/v) de glicerol.

A fermentação em soro de leite foi precedida pela reativação das cepas, onde as culturas estocadas foram inoculadas em 5 mL de caldo De Man Rogosa and Sharpe (MRS) e incubadas a 30 e 37° C durante 24 h.

O soro de queijo utilizado no presente estudo foi cedido por uma pequena fábrica localizada em Pesqueira/ PE. A caracterização foi determinada através da análise dos parâmetros: acidez titulável, glicídios redutores em lactose e cinzas (Adolfo Lutz Instituto, 2008); proteína (Bradford, 1976) e avaliação do potencial hidrogeniônico (pHmetro, marca:BEL; modelo: PHS3BW). Antes da fermentação, o soro de queijo foi desproteinizado e esterilizado a 121° C por 20 min.

2.2 Seleção da bactérias ácido láticas quanto a produção de .exopolissacarídeos

Em cada frasco Erlenmeyer de 25 mL, o soro pré tratado foi adicionado juntamente com 2% (v/v) das cepas resultando no volume total de 10 mL. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufas microbiológicas com temperaturas ajustadas em 30 e 37° C durante 24 h. Ao final da fermentação, as culturas foram centrifugadas a 5000g por 10 min a fim de obter o sobrenadante contendo o EPS.

2.3 Extração, purificação e análises químicas de EPS

0,1 M de NaCl foi adicionado ao sobrenadante para remoção de proteínas e mantido a 4° C por 24 h. Após esse período, a amostra foi centrifugada (5000 g por 10 min) e o

sobrenadante livre de proteínas foi tratado pela adição de 80 % (v/v) de etanol e acondicionado por mais 24 h a 4° C, para obtenção do EPS. Em seguida, o material foi centrifugado sob as mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi descartado, o pellet (EPS) coletado e liofilizado para as análises químicas subsequentes.

A determinação de carboidratos totais e redutores foram realizadas pelos métodos descrito por Dubois et al. (1956) e Miller et al. (1959), respectivamente. utilizando a glicose para confecção da curva padrão. Para a determinação de proteínas totais, utilizou-se o método de Bradford (1976), baseado na curva padrão de Albumina Sérica Bovina (BSA). O teor de ácido urônico foi determinado de acordo com o método de Dishe (1947), com auxílio da curva padrão α-glucurolactona. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (UV/visible spectrophotometer, UV-1600PC) e Bioespectro-SP 22.

2.4 Análise de infravermelho

Para a detecção de grupos funcionais presentes no EPS, foi utilizado o espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Bruker modelo Vertex 70. 1 mg da amostra foi preparada junto a 100 mg de KBr seco e pressionados para formação de um molde, seguido de escaneamento, onde foi analisada a região de infravermelho médio na faixa de 4000-500 cm^{-1}.

2.5 Identificação molecular

A identificação molecular da BAL selecionada como melhor produtora de EPS foi realizada em laboratório de genética da Universidade Federal de Pernambuco. A bactéria foi submetida ao procedimento de extração e purificação do DNA, pela metodologia descrita por Sambrook et al., (1989), seguido da genotipagem usando o gene 16s para o sequenciamento do rRNA.

2.6 Delineamento experimental estatístico para produção de EPS

Um planejamento fatorial completo 2^3 com quatro pontos centrais foi elaborado para estudar os efeitos e interações entre os seguintes parâmetros de produção e seus respectivos níveis: temperatura, pH e tempo de fermentação (+1, 1, -1) sobre a produção de EPS por BAL cultivada em meio soro de leite (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis independentes e níveis codificados para produção de EPS por BAL

Variáveis independentes	**Níveis**		
	-1	**0**	**+1**
Temperatura °C	25	35	45
pH*	5,5	6	6,5
Tempo de fermentação (h)	18	24	30

As variáveis que apresentaram influência na produção, foram selecionadas e ajustadas para novo delineamento estatístico usando o Central Composto (CCD) com configuração estrela para obter um modelo de segunda ordem. Os coeficientes de regressão linear e quadrático e interações entre cada variável foram determinados e ajustados por meio de equação polinomial de segunda ordem:

$$Y = \beta 0 + \beta_1 X_1 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_1 X_2^2 + X_1 X_2 \beta_1 \beta_2$$

Onde, Y é a variável dependente (produção de EPS), $\beta 0$ é a constante do modelo, $\beta_1 X_1$ e $\beta_2 X_2$ representam o coeficiente linear das variáveis independentes e $\beta_1 X_1^2$ e $\beta_1 X_2^2$ representam o coeficiente quadrático das variáveis independentes.

Para a validação do delineamento estatístico obtido, foi realizada uma nova produção de EPS com quatro repetições utilizando as condições ótimas previstas pelo modelo. Cada fator de interação foi estudado considerando influências significativas nas respectivas respostas em 95% de nível de confiança ($p<0,05$). Todo projeto estatístico foi realizado com o auxílio do software Statistic@ 7.0.

2.7 Determinação do potencial antioxidante in vitro de EPS

Os ensaios de potencial antioxidante de EPS foram avaliados conforme descrito abaixo. Os experimentos foram em triplicata com concentrações 0,5; 1; 1,5; e 2 mg/mL de EPS e do controle (ácido ascórbico). A absorbância foi medida em o espectrofotômetro (UV/visível, UV-1600PC). O software GraphPad Prism versão 9.0 (San Diego, EUA) foi utilizado para a análise estatística dos dados. Em que as diferenças de significância entre os grupos foram comparadas por meio da análise de variância (ANOVA), onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.7.1 DPPH

O ensaio in vitro para testar a capacidade de sequestro do radical DPPH por EPS foi realizado pelo método descrito por Shimada et al. (1992), com algumas modificações. 0,5 mL de DPPH (solução contendo 0,1 mmol/L em 95% de etanol) e 0,5 mL de EPS foram acondicionados em câmara escura por 30 min em temperatura ambiente. Após tempo de reação, as absorbâncias foram mensuradas, rapidamente, a 485 nm. A capacidade de EPS reduzir DPPH foi indicada pela mudança de cor roxa para amarela e quantificada através da equação:

$$\text{Capacidade antioxidante } \% = 1 - \left[\frac{As - A0}{A}\right] x\ 100$$

As é a absorbância do ensaio na presença da amostra, **A0** é a absorbância da amostra com etanol e **A** é a absorbância do ensaio sem a amostra.

2.7.2 Redução do radical hidroxila

A eliminação de radicais hidroxila por EPS foi determinada usando o método descrito por Zhang et al. (2013). O efeito da amostra foi testado com a reação de Fenton. 1,0 ml q de verde brilhante (0,435 mM) foi misturado com 2,0 ml de FeSO4 (0,5 mM), 1,5 ml de H2O2 (3,0%, p/v) e 1,0 ml de EPS (0,2 a 2 mg/ml). A mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 20 min e a absorbância medida a 624 nm. A eliminação de radical hidroxila foi

calculada como a seguinte equação:

$$\text{Capacidade antioxidante \%} = \left[\frac{As-A0}{A-A0}\right] x100$$

As é a absorbância na presença da amostra, **A0** é a absorbância do controle na ausência da amostra, e **A** é a absorbância sem a amostra e o sistema de reação de Fenton.

2.7.3 Redução do radical ABTS

O método utilizado para o ensaio ABTS foi descrito por Re et al. (1999) com algumas modificações. Primeiramente, o radical catiônico ABTS+ foi preparado pela reação da solução estoque ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) no escuro por 16 h à temperatura ambiente. A solução ABTS+ foi diluída em PBS (0,1 M, pH 7,4) até absorbância de 0,700 ± 0,02 a 734 nm antes da reação. O ensaio antioxidante foi feito pela mistura de 0,1 ml de EPS (0,2 a 2 mg/ml) em 3,9 ml de ABTS+. Após 6 min, a absorbância da mistura foi medida a 734 nm. A eliminação de ABTS foi calculada com a seguinte equação:

$$\text{Capacidade antioxidante \%} = \left(1 - \frac{A}{A0}\right) x\ 100$$

As é a absorbância na presença da amostra, A0 é a absorbância do controle na ausência da amostra.

2.7.4 Redução do íon superóxido

A determinação do potencial de sequestro do radical superóxido por EPS foi realizada de acordo com o método descrito por Wang et al. (2017) com algumas modificações. O ensaio foi feito pela mistura de 1,0 mL de EPS (0,2 a 2 mg/ml) e 3,0 ml do tampão Tris-HCL (50 mM, pH 8,0). Em seguida, incubado a 25°C por 20 min. Ao final do tempo, foi adicionado 0,3 mL de solução de pirogalol e a mistura foi mantida a 25°C por 5 min. Depois disso, 1 mL de HCL foi adicionado para finalizar a reação. O tampão Tris-HCL foi usado para calibrar o

espectrofotômetro UV e a absorbância foi determinada em 325 nm. A eliminação de radicais foi calculada com a seguinte equação:

$$\text{Capacidade antioxidante } \% = \left[1 - \left(\frac{A_1 - A_2}{A_0}\right)\right] \text{x}100$$

A1 é a absorbância do ensaio com a presença da amostra, A2 é a absorbância do tampão Tris-HCL com EPS, A0 é a absorbância do tampão Tris-HCL com pirogalol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de bactéria ácido lática quanto a síntese de EPS

Um total de 64 cepas de BAL foram avaliadas quanto a produção de EPS pela fermentação do soro de queijo. Através do teste de determinação de carboidratos totais, foi possível constatar a presença de EPS na maioria das cepas, porém, entre as referidas cepas, a 133v demonstrou maior concentração de EPS com 5,58 mg/mL (Figura 1). Esses resultados preliminares demonstraram que o soro apresentou potencial fonte de carbono para a síntese do biopolímero, principalmente devido a presença da lactose em sua composição (Tabela 2).

Figura 1. Resultados da produção de EPS por BAL pela fermentação do soro de queijo.

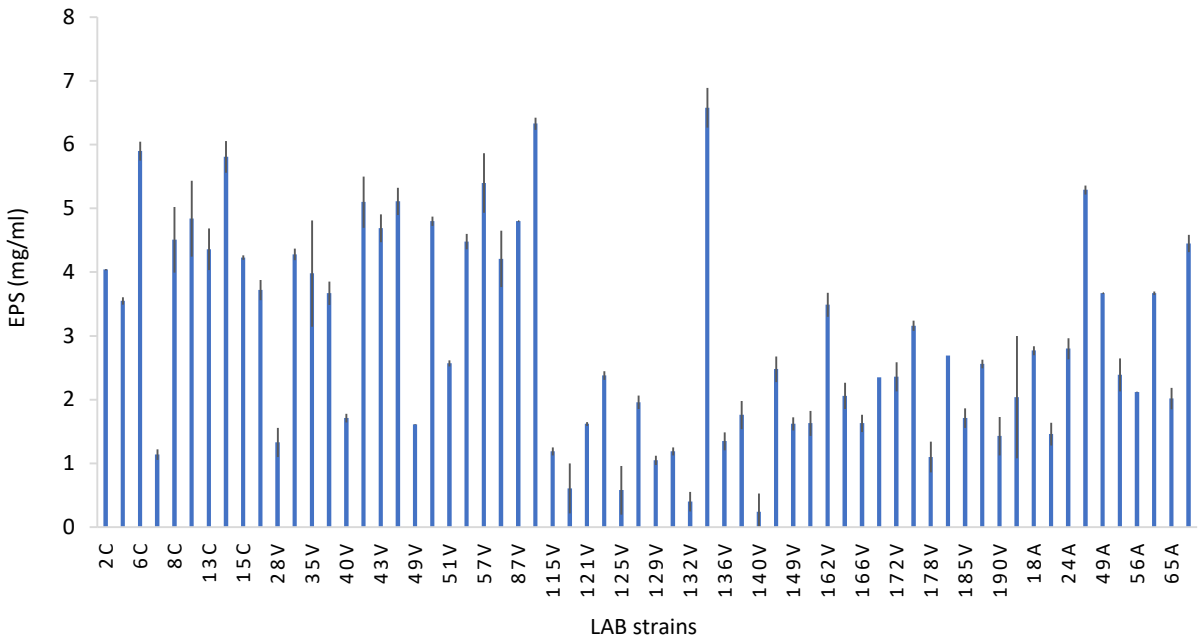


Tabela 2. Caraterização do soro de queijo de coalho.

Parâmetros	Quantificação
pH	6,2 ± 0,2
Acidez	25° D ± 1,0
Proteinas	0,0836 mg/mL ± 0,007
Cinzas	0,70 % ± 0,02
Lactose	5,21 % ± 0,08

3.2 Identificação molecular da BAL produtora de EPS

O isolado 133v foi caracterizado como cocos gram positivos e catalase negativa. A determinação filogenética pelo sequenciamento do gene 16s e após submissão ao banco de genes GenBank: MG551256.1, demonstrou uma semelhança de 94% com a espécie *Enterococcus faecium*. As sequências obtidas a partir do sequenciamento estão presentes na tabela 3. A partir disso, o EPS produzido pela BAL *Enterococcus faecium* 133v foi denominado EPS133v.

Tabela 3. Sequenciamento obtido para identificação da cepa 133v.

Microrganismo	Sequência de bases do DNA
Enterococcus faecium 133v	AGGGCACGCCTATCATGCAGTCGAACGCTTCTTTTTCCCCGSAGCTTGCT CCCCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAAGGGGTGACTAACGCGTGGGTAACCTG CCCATCRGAAGGGGATAGCACTTGGAAACWGGTGCTAMTACCGTATAACA RTCGAAACCGCGKGGYTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCSCTGAT GGATGGACCCGCKGKGSATTARCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG GCCACKATGCRTAKCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGA GACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAAT GGACGAAAGTCTGACCGAKCAACRCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGA TCGTAAAACTCTGTTGTTAKAGAARAACAMKGATGASAGTAACTGTTCAT CCCTTGACGGTATCTAACCASAAAGCCMCGGCTAACTACGTGCCASCARC CGCGGTAATACKTAKGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAK CGAGCGCAKGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAWCCG GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGARACTTGAGTGCAKAASAGGAGAGTGGA ATTCCATGTGTAGCGKTGAAATGCGTASATATATGGAGGAACACCMSTGG CGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGAG GAGCAMACAGGATTAGATACCCTGRTARTCCACGCCGTAAACGATGAGTG CTAAGTGTTGGAGGGYTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG CACTCCSCCTGGGGAGTACGACCRYRAGGTTGAAACTCAMMSGMAYTWGA CGGGGGACCCRTCAYGAAKCKRRTGKSAGCATGWGSGYTTAATWWCGCA WGCMAYGGCGCAATGAACCCTKTACYRGGATCTTTGACATMCCWTTTGGA CCACTSTMGTASATAGAKCWTTMCCCTTTCGGGGGGKCCAAGTGASWCGT TSATGCYATGGGTCGTCGATCATGCTTCCGGGTCATGACAKSTAGGGGATC AGATCACGCACAAAGRAGSCSMMAMCA

3.3 Caracterização parcial da composição química

As análises químicas quantitativas de EPS133v, revelaram a presença de ácido urônico, constituindo 1,86% da composição. A variação da concentração de ácido urônico entre 1 e 30%, foram observados em outros estudos que também utilizaram BAL para produção de EPS SHANKAR et al., 2021; LYER et al., 2005; WANG et al., 2015). Proteínas foram estimadas em 5,28 % da composição, enquanto nos resultados obtidos por Adesulu-dahunsi et al. (2018), o EPS de *Weissella cibaria* exibiu aproximadamente 1,12% de proteínas. A presença de açúcares totais foi estimada em 20,84%, o que difere expressivamente dos demais trabalhos, como os relatados por Adesulu-dahunsi et al. (2018) e Imran et al. (2016) com valores entre 80-90%. O ensaio de DNS resultou em 0,09% da composição de açúcares redutores.

A presença de grupos funcionais em EPS133V por meio da leitura em infravermelho (FT-IR) estão apresentadas através de bandas de absorção na faixa de 4000 – 500 cm $^{-1}$ (Figura 2). O pico observado na região 3269 cm $^{-1}$ é marcado pela presença de grupos hidroxila e um fraco alongamento C-H pode ser observado na região 2964 cm $^{-1}$ (ABDHUL et al., 2014; ADESULU-DAHUNSI et al., 2018; ZHANG et al., 2020). A região marcada entre 1635 e 1562 cm $^{-1}$ pode ser atribuída à vibração de alongamento do C=O do grupo amina e pela presença de proteínas, o que corrobora com o resultado do teste para presença de proteína, mostrado no parágrafo acima (CHEN et al., 2015; WANG et al., 2010). Os picos de absorção em 1440 e 1406 cm $^{-1}$ são característicos da presença de carboxila (COO-) (GALLÓN et al., 2019; ZHU et al., 2019; HU et al., 2021). Isso também está associado a presença de resíduos de ácido urônico, detalhe consistente com os resultados quantitativos. Uma grande banda próxima a 1068 cm $^{-1}$ é geralmente relacionada ao tipo de ligação glicosídica (LIU et al., 2019), porém o tipo de ligação sugere a interpretação por meio de outros testes de caracterização química. Por fim, os pequenos picos que aparecem nas bandas 661 e 599 cm $^{-1}$ representam a existência de grupos

sulfatados, também visualizados no trabalho de ZHANG et al. (2020). Com base nos dados, infere-se que a presença de grupos funcionais por meio da leitura em infravermelho nos leva a confirmar características típicas de polissacarídeos.

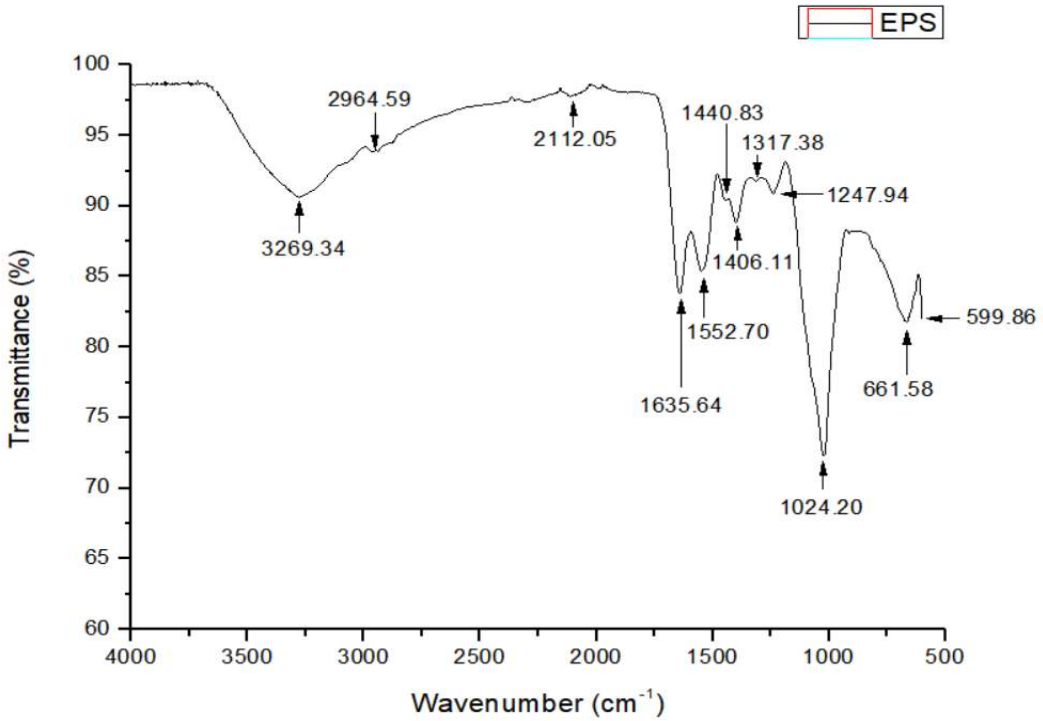


Figura 2. Espectroscopia em infravermelho para presença de grupos funcionais em EPS133v.

3.4 Otimização da produção de EPS por delineamento experimental estatístico

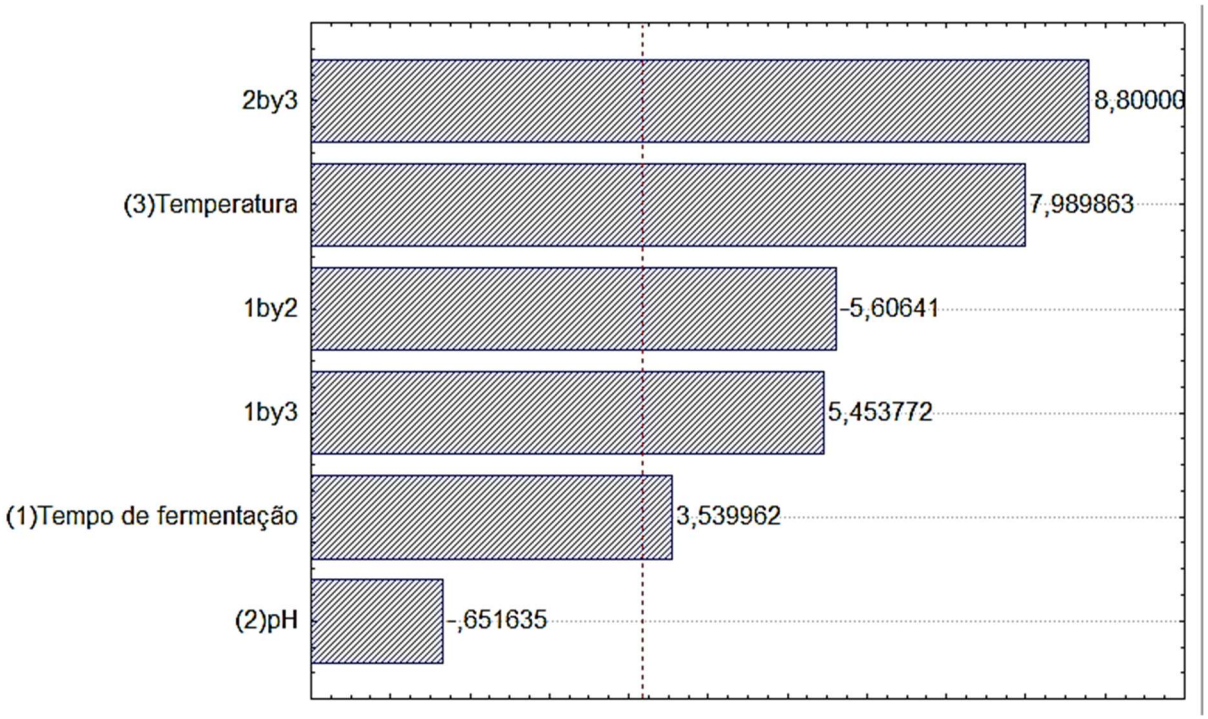
3.4.1 Planejamento fatorial completo

Os resultados do planejamento fatorial completo 2^3 que mostram a influência das variáveis independentes (temperatura, pH e tempo de fermentação) sobre a variável dependente (produção de EPS) estão presentes na tabela 4. Um total de doze ensaios com quatro pontos centrais, mostraram que a produção de EPS133v, por meio do ensaio de açúcares totais, variou em uma faixa de 17,51 a 27,2 mg/mL (tabela 4). A partir desses resultados, foi gerado o gráfico de Pareto (Figura 3). Dentre as variáveis independentes, a produção de EPS foi mais

influenciada pela temperatura e pelo tempo (efeito estatisticamente significativo a 95%) e sugere o aumento nos níveis de ambas. O pH não apresentou influência na produção. Alguns trabalhos também relatam que a produção de EPS pelas BAL é influenciada pela temperatura e tempo de incubação (GROBBEN et al., 1995; KIMMEL et al., 1998; DEEPAK et al., 2016; LI et al., 2020).

Tabela 4. Matriz contendo o delineamento experimental completo realizado para avaliar a influência das variáveis independentes sobre a produção de EPS por BAL.

Variáveis independentes (valores reais e codificados)				Variável dependente
Ensaios	Tempo (h)	pH	Temperatura (°C)	EPS (mg/mL)
1	18(-1)	5,5(-1)	25(-1)	17,51
2	30(+1)	5,5(-1)	25(-1)	24,14
3	18(-1)	6,5(+1)	25(-1)	20,93
4	30(+1)	6,5(+1)	25(-1)	12,67
5	18(-1)	5,5(-1)	45(+1)	19,9
6	30(+1)	5,5(-1)	45(+1)	21,06
7	18(-1)	6,5(+1)	45(+1)	20,7
8	30(+1)	6,5(+1)	45(+1)	27,2
9	24(0)	6(0)	35(0)	25,21
10	24(0)	6(0)	35(0)	25,4
11	24(0)	6(0)	35(0)	25,36
12	24(0)	6(0)	35(0)	24,13



Efeito (valor absoluto)

Figura 3. Gráfico de pareto ilustrando os efeitos das variáveis independentes: temperatura, pH e tempo de fermentação.

3.4.2 Delineamento experimental central composto para produção de EPS.

O projeto central composto foi usado para determinar o nível de otimização de dois parâmetros significativos na produção de EPS. O pH inicial foi fixado em 6 e as variáveis significativas (temperatura e tempo de incubação) foram ajustadas conforme análise estatística observada no planejamento fatorial (seção 3.4.1) gerando a matriz com os resultados de produção de EPS e seus respectivos valores previstos pelo programa (tabela 5). Os resultados obtidos com o delineamento pelo central composto mostraram que a maior concentração de EPS foi de 27,45 mg/mL, obtido em um dos pontos centrais, correspondendo aos parâmetros 40 °C de temperatura e 26 h de fermentação.

Tabela 5. Matriz contendo os parâmetros do modelo linear considerando a influência das variáveis independentes sobre a produção de EPS por BAL (resultados reais e previstos), de acordo com o planejamento fatorial completo.

Variáveis independentes (valores reais e codificados)			Variável dependente	
Ensaio	Temperatura (°C)	tempo (h)	EPS (mg/mL)	EPS (mg/ml) Previsto
1	30(-1)	20(-1)	20,25	19,27
2	30(-1)	20(-1)	24,92	22,16
3	50(+1)	20(-1)	8,25	10,18
4	50(+1)	32(+1)	21,29	19,52
5	35,9(-1,4)	26(0)	19,74	16,50
6	54,1(+1,4)	26(0)	9,18	8,21
7	40(0)	14,5 (-1,4)	21,0	18,89
8	40(0)	34,4 (+1,4)	24,37	27,54
9	40(0)	26(0)	27,45	24,74
10	40(0)	26(0)	26,93	24,74
11	40(0)	26(0)	26,75	24,74
12	40(0)	26(0)	27,18	24,74

Para avaliar a adequação do ajuste proposto pelo modelo, os dados experimentais foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Na tabela 6, de acordo com o ANOVA, os resultados indicam que o efeito linear e quadrático da temperatura e tempo de fermentação

foram significativos para a resposta produção de EPS, exceto pela combinação de ambos os parâmetros

Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) dos modelos linear e quadrático para produção de EPS

Fator	Média quadrática	Valor de F	Valor de P
1 Temperatura (°C) (L)	116,8072	29,53924	0,001610
Temperatura (°C) (Q)	248,0872	62,73845	0,000215
2 Tempo (h) (L)	61,3977	15,52678	0,007621
Tempo (h) (Q)	29,2913	7,40745	0,034566
1L com 2L	16,4836	4,16852	0,087239
Erro puro	3,9543		

$R^2 = 0.94979$ $R_{adj} = 0.90796$
Valor significante = $p < 0.05$.

O modelo apresentou 95% de confiabilidade, indicado pelo R^2 (0,94979), seguido de 90% de seu valor ajustado, indicado pelo R^2_{Adj} (0,90796). Isso significa que a variação atribuída aos parâmetros para produção de EPS é explicada em 95% e que o modelo não necessita de ajuste, uma vez que o mesmo foi adequado com poucos parâmetros e ensaios (HAALAND, 1989). Com isso, este modelo estatístico apresenta confiabilidade possibilitando prever satisfatoriamente o valor do EPS. A equação polinomial de segunda ordem codificada com as variáveis pode explicar a síntese de EPS juntamente com as interações de segunda ordem. O modelo obtido é mostrado pela equação:

$$Y = 26{,}91 - 7{,}65X_1 - 12{,}49X_1^2 + 5{,}55X_2 - 4{,}31X_2^2 + 4{,}06X_1X_2$$

Y é a variável dependente, X_1 e X_2 representam o coeficiente linear das variáveis independentes e X_1^2 e X_2^2 o coeficiente quadrático das variáveis independentes.

Na figura 4, as condições para produção de EPS são ilustradas por meio do gráfico de superfície de resposta. Os resultados indicam que a maior produção de EPS em soro de queijo pode ser obtida com o aumento da temperatura, pouco acima de 40 °C. A partir dos 50 °C não

há evidência de produção do EPS133v (Figura 4).

Alguns trabalhos encontrados na literatura diferem de nossos achados. Kimmel et al., (1998) otimizaram a produção de EPS por *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* em meio semidefinido e observaram a temperatura ótima de 38 °C. Um mais recente, realizado por Adesulu-Dahunsi et al. (2018) constataram que a temperatura ótima para produção de EPS por *Weissela cibaria* é de 30 °C. Essa divergência nas condições de produção pode estar associada a via de biossíntese de EPS, o que varia de bactéria para bactéria (SUTHERLAND, 1972). No caso de BAL do gênero *Enterococcus*, há peculiaridades que diferem o comportamento desse gênero das demais. De acordo com Krawczyk et al. (2021), o *Enterococcus* tem capacidade de produzir grandes quantidades de EPS devido à sua resistência a condições estressantes (maior pH, temperatura, osmolaridade). Portanto, apesar da alta temperatura ser fator estressante, é um parâmetro tolerável pelo *Enterococcus faecium*, o que impulsiona a síntese de EPS.

Na figura 4, o gráfico demonstra uma faixa maior de tempo de incubação, podendo variar entre 20-25 h. Na literatura, alguns autores relatam produção de EPS em tempo mais prolongado, porém, assim como a temperatura, o tempo também pode diferir de acordo com a cepa usada. No estudo realizado por Li et al. (2020), por exemplo, o tempo de fermentação para a produção de EPS por *Lactobacillus platarum* foi de 48 h. Neste trabalho, a cepa Entenrococcus faecium foi fermentada em temperatura elevada, o que caracteriza uma condição de estresse fisiológico. Tal condição impulsiona a produção de EPS nas primeiras horas de fermentação, porém, nas próximas horas pode ocorrer a diminuição da concentração de EPS devido a síntese de enzimas hidrolíticas que degradam o polissacarídeo (PHAM et al., 2000).

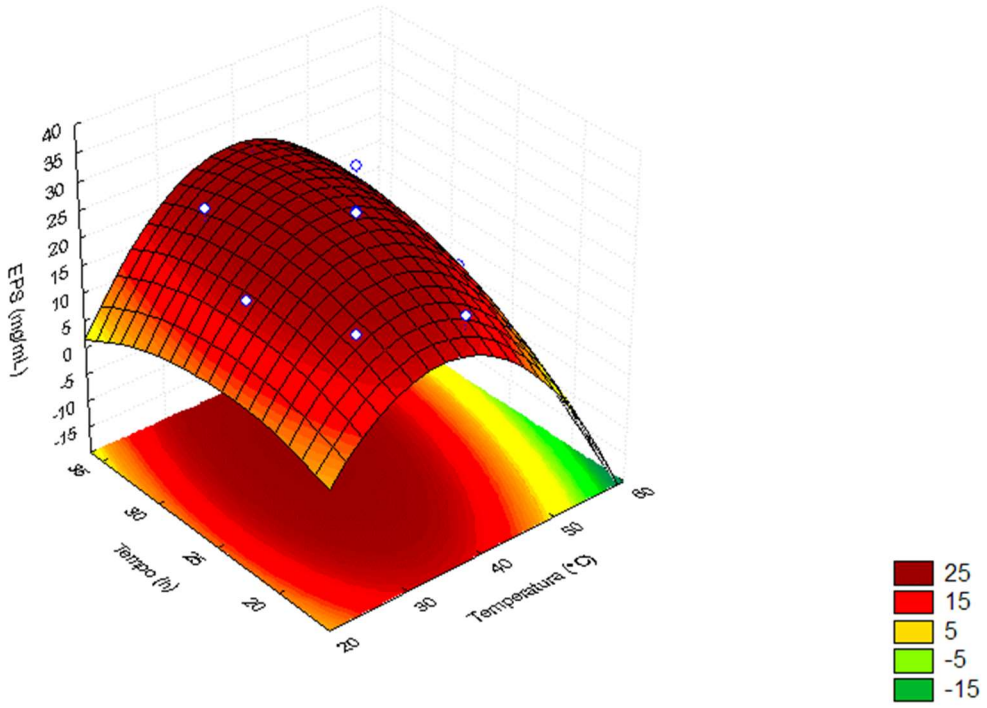


Figura 4. Gráfico de superfície de resposta contendo os efeitos da combinação de variáveis sobre a produção de EPS133v em soro de queijo.

3.4.3 Validação

A partir do delineamento central composto, as condições ótimas encontradas para a produção de EPS133v pelo *Enterococcus faecium* usando o modelo proposto (Seção 3.4.2), foram 42,3 ◦C de temperatura e 22 h de tempo de fermentação. Nestas condições, o modelo previu uma produção de EPS de 20 mg/mL enquanto o valor real obtido foi de 21,74 mg/ml, o que representa um aumento em mais de 300% da concentração quando comparado ao valor inicial de 5,58 mg/mL (Seção 3.1).

3.5 Determinação da atividade antioxidante in vitro

A redução do radical DPPH por EPS133v é mostrado na Figura 4a. A medida em que houve o aumento da concentração de EPS também houve o aumento da capacidade antioxidante contra o radical DPPH, obtendo atividade máxima de 27% com 2 mg/mL da amostra. O ácido ascórbico apresentou alta atividade em todas as concentrações usadas, mantendo-se constante com 93,72%. Alguns estudos também observaram a atividade antioxidante dependente da

concentração de EPS produzido por BAL. Assim como neste estudo, Abdhul et al. (2014) testou EPS produzido por *E. faecium* e obteve 20% da capacidade antioxidante com 2 mg/mL da amostra. Zhang et al (2013) observaram o aumento da atividade de EPS produzido por *Lb. plantarum* entre as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL com mais de 40% de capacidade.

A atividade redutora do radical hidroxila presente na figura 4b, demonstra atividades, relativamente, baixas tanto por EPS quanto por ácido ascórbico, atingindo a marca de 1,29 % e 56,19% em 2 mg/mL, respectivamente. Concentrações abaixo de 2 mg/mL de EPS não apresentaram atividade, o que nos leva a entender que para redução de hidroxila é necessário altas concentrações do polímero. Esses achados corroboram com os de Wang et al. (2020) que também observaram atividade antioxidante baixa para EPS de *Leuconostoc citreum* contra o radical hidroxila. Em seus achados, 2 mg/mL de EPS reduziu hidroxila em menos de 10%, com o aumento da concentração em 15 mg/mL o EPS reduziu hidroxila em 13%, apenas. Em contrapartida, vários autores observaram atividade de EPS de BAL contra hidroxila acima de 30% em concentrações abaixo de 2 mg/mL (ABDHUL et al., 2014; ZHANG et al., 2016; MIN et a., 2019).

Na figura 4c, a atividade contra o radical ABTS foi mais elevada comparado aos demais radicais. O EPS133v e o ácido ascórbico exibiram atividade de 72,20% mg/mL e 97%, respectivamente. Min et al. (2019) relataram que o EPS produzido por *Lb. plantarum* reduziu ABTS em mais de 50% com concentração de 7 mg/mL, enquanto neste estudo o EPS133v atingiu mais de 50% com apenas 0,2 mg/mL (Figura 4c)

A capacidade máxima de redução do radical superóxido por EPS133v foi de 43,23%, porém vale ressaltar que em todas as concentrações a atividade foi constante, com poucas oscilações, assim como o ácido ascórbico. Logo, em sua concentração inicial de 0,2 mg/mL o EPS reduziu peróxido em quase 40% e o ácido ascórbico, pouco mais de 80%. Nos estudos de Rajoka et al. (2018) e Wang et al. (2020), EPS de *Leuconostoc citreum* e *Lb.rhamnosus*

reduziram superóxido em 8,69 % e 5,9% com 4 mg/mL, respectivamente. O EPS133v, com apenas 0,2 mg/mL reduziu peróxido em quase 40%. Outros trabalhos também relataram boa atividade de EPS de BAL frente a redução do peróxido (ADESULU-DAHUNSI et al., 2018; ZHANG et al., 2016).

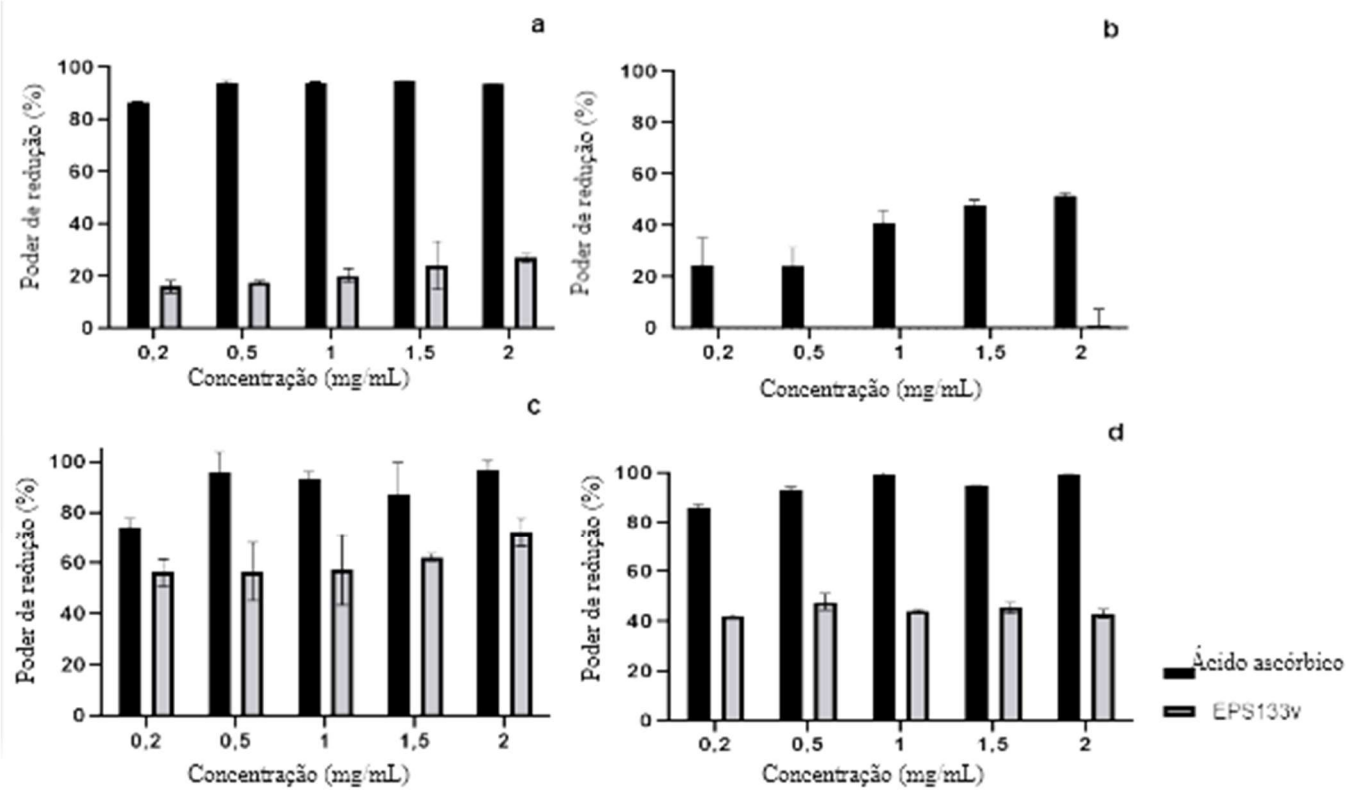


Figura 5. Atividades antioxidantes in vitro do EPS133v contra diferentes radicais. (a) DPPH, (b) Hidroxil, (c) ABTS e (d) Superóxido.

Os resultados mencionados sugerem que a eliminação de radicais por EPS133v podem ser influenciadas pela estrutura polimérica, como: peso molecular, grupos funcionais e conformação da cadeia (ANDREW & JAYARAMAN, 2020). A baixa atividade relativa ao radical hidroxila, por exemplo, provavelmente se deve a pequena quantidade de ácido urônico na cadeia (Figura 4b), o que pode ser confirmado pelos resultados obtidos na seção 3.3. Segundo Xu et al. (2012), a presença de ácido urônico 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. Portanto, a baixa quantidade de ácido urônico em EPS133v explica a

necessidade de maiores concentrações para redução de hidroxila. Por outro lado, seu efeito nos demais radicais, sugerem que a presença de grupos hidroxila tenha contribuído, afinal esses grupos fornecem átomos de hidrogênio que se ligam a radicais para formar outros produtos (LIN et a., 2009). Segundo Andrew & Jayaraman (2020), moléculas de carboidratos tem capacidade de doar elétrons devido a presença de açúcares redutores. Para excluí essa possibilidade, foi verificado a presença de açúcares redutores na amostra através do ensaio usando o ácido dinitrosalicílico (MILER et a., 1959). Foi observado uma concentração de 0,09%, o que não aparenta relevância para efeitos de redução de radicais.

Em suma, EPS133v produzido por *Enterococcus faecium* exibiu relevante atividade antioxidante contra os radicais DPPH, ABTS e superóxido, o que sugere que esse EPS tem potencial aplicação como aditivo alimentar natural atuando na preservação de alimentos. Entretanto, é importante ressaltar a necessidade de estudos adicionais de caracterização estrutural do biopolímero para obter resultados que possam correlacionar sua composição estrutural e propriedades biotecnológicas de forma mais conclusiva.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, dentre 64 bactérias ácido láticas, *Enterococcus faecium* cultivada em soro de queijo foi selecionada para produção de EPS. As condições de produção de EPS foram determinadas por meio de delineamento experimental estatístico, onde sob 42 °C de temperatura e 22 h de fermentação, o modelo previu concentração de EPS em 20 mg/mL e após validação, obteve-se 21 mg/mL. O EPS também apresentou propriedades antioxidante contra os radicais DPPH, ABTS e superóxido através dos ensaios realizados in vitro. Por fim, o uso do soro de queijo em substituição do meio comercial foi eficaz, uma vez que foi possível obter um biopolímero natural e seguro sem utilizar aditivos no soro. Ao mesmo tempo, o estudo pôde ressaltar o valor nutricional do soro como um bom substrato de baixo custo e trazendo mais uma via de aplicação desse efluente no setor biotecnológico.

5. REFERÊNCIAS

ABDHUL, Kaja et al. Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p. 450-454, 2014.

ADESULU-DAHUNSI, A. T.; SANNI, A. I.; JEYARAM, K. Production, characterization, and in vitro antioxidant activities of exopolysaccharide from *Weissella cibaria* GA44. **LWT**, v. 87, p. 432-442, 2018.

ANDREW, Monic; JAYARAMAN, Gurunathan. Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. **Carbohydrate research**, v. 487, p. 107881, 2020.

ARAÚJO, Magno de Souza et al. Produção de Etanol Neutro a partir do soro de queijo coalho por destilação convencional. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry,** v. 72, p. 248-254, 1976.

CERNING, J.; MARSHALL, V. M. E. Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. **Recent Results and Developments**, v. 3, p. 195-209, 1999.

CHEN, Zhina et al. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. **International Dairy Journal**, v. 43, p. 15-21, 2015.

DE CARVALHO, Catherine Teixeira et al. Potential of "coalho" cheese whey as lactose source for β-galactosidase and ethanol co-production by *Kluyveromyces spp*. yeasts. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 9, p. 925-934, 2020.

DEEPAK, Venkataraman et al. Optimization of anticancer exopolysaccharide production from probiotic *Lactobacillus acidophilus* by response surface methodology. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 288-297, 2016.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. T., & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DISCHE, Zacharias. A new specific color reaction of hexuronic acids. **Journal of biological Chemistry**, v. 167, n. 1, p. 189-198, 1947.

ERGÜDER, T. H. et al. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. **Waste management**, v. 21, n. 7, p. 643-650, 2001.

GALLÓN, Sandra M. Navarro et al. Characterization and study of the antibacterial mechanisms of silver nanoparticles prepared with microalgal exopolysaccharides. **Materials Science and**

Engineering: C, v. 99, p. 685-695, 2019.

GHALY, Abdel E. et al. Potential environmental and health impacts of high land application of cheese whey. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 2, p. 106-117, 2007.

GROBBEN, Gert J. et al. Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, n. 1, p. 103-107, 1995.

HAALAND, Perry D. Statistical problem solving. **Experimental design in biotechnology**, p. 1-18, 1989.

HU, Shu-Min et al. Purification, characterization, and biological activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* ZFM231 isolated from milk. **LWT**, v. 147, p. 111561, 2021.

IYER, Anita; MODY, Kalpana; JHA, Bhavanath. Characterization of an exopolysaccharide produced by a marine. *Enterobacter cloacae*. 2005.

IMRAN, Mohamed Yousuff Mohamed et al. Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 731-745, 2016.

KORCZ, E.; KERÉNYI, Z.; VARGA, L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. **Food & function**, v. 9, n. 6, p. 3057-3068, 2018.

KIMMEL, Stacy A.; ROBERTS, Robert F.; ZIEGLER, Gregory R. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 659-664, 1998.

KRAWCZYK, Beata et al. The many faces of *Enterococcus spp.*—Commensal, probiotic and opportunistic pathogen. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1900, 2021.

LI, Chengcheng et al. Bioconversion of cheese whey into a heteroexopolysaccharide via a one-step bioprocess and its applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107701, 2020.

LIN, C. L. et al. Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum Linnaeus.* **International journal of biological macromolecules**, v. 45, n. 2, p. 146-151, 2009.

LIU, Guo-ku et al. Three exopolysaccharides from the liquid fermentation of *Polyporus umbellatus* and their bioactivities. **International journal of biological macromolecules**, v. 132, p. 629-640, 2019.

LIMA, José Pedro Carvalho. Instituto Adolfo Lutz. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, n. 1, p. 5-20, 1941.

LYNCH, Kieran M. et al. Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: Isolation, properties, characterization, and health benefits. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 155-176, 2018.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

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

MOLLEA, Chiara; MARMO, Luca; BOSCO, Francesca. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: **Food industry**. IntechOpen, 2013.

NAGAOKA, Masato et al. Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 8, p. 1012-1017, 1994.

NAKAJIMA, Hajime et al. Structure of the extracellular polysaccharide from slime forming *Lactococcus lactis subsp. cremoris* SBT 0495. **Carbohydrate Research**, v. 224, p. 245-253, 1992.

PATEL, Ami et al. Probiotic properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented foods. **International Journal of Fermented Foods**, v. 1, n. 1, p. 87-102, 2012.

PHAM, P. L. et al. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2302-2310, 2000.

PRAZERES, Ana R.; CARVALHO, Fátima; RIVAS, Javier. Cheese whey management: A review. **Journal of environmental management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

PRETE, Roberta et al. Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: A sustainable tool for functional foods. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1653, 2021.

RAJOKA, Muhammad Shahid Riaz et al. Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. **Lwt**, v. 89, p. 638-647, 2018.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RODRÍGUEZ-CARVAJAL, Miguel A. et al. Structure of the high-molecular weight exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus pentosus* LPS26. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 18, p. 3066-3070, 2008.

SANALIBABA, P.; ÇAKMAK, G. Aybige. Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. **Applied Microbiology.** v. 2, n. 115, p. 10.4172, 2016.

SAMBROOK, Joseph et al. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. 1989.

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

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. **Advances in microbial physiology**, v. 8, p. 143-213, 1972.

SHANKAR, Thiruvengadam et al. Biomedical and therapeutic potential of exopolysaccharides by *Lactobacillus paracasei* isolated from sauerkraut: Screening and characterization. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 5, p. 2943-2950, 2021.

TOK, Esra; ASLIM, Belma. Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. **Microbiology and immunology**, v. 54, n. 5, p. 257-264, 2010.

YADAV, Jay Shankar Singh et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 756-774, 2015.

XU, Ren-Bo et al. Chemical composition and antioxidant activities of three polysaccharide fractions from pinecones. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 11, p. 14262-14277, 2012.

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

ZHANG, Wen-ping et al. Structural characterization and induced copper stress resistance in rice of exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* LPC-1. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 1077-1088, 2020.

ZHOU, Yang; CUI, Yanhua; QU, Xiaojun. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity, and associations: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 207, p. 317-332, 2019.

ZHU, Yuanting et al. Exopolysaccharides produced by yogurt-texture improving *Lactobacillus plantarum* RS20D and the immunoregulatory activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 121, p. 342-349, 2019.

WANG, Yanping et al. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 895-903, 2010.

WANG, Ji et al. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate polymers**, v. 125, p. 16-25, 2015.

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

WANG, Yu et al. Optimization and characterization of exopolysaccharides with a highly branched structure extracted from *Leuconostoc citreum* B-2. **International journal of biological macromolecules**, v. 142, p. 73-84, 2020.

CAPÍTULO 2- ANEXOS

Can postbiotic shows antiviral effects against COVID-19?

Artigo de revisão publicado em 2021 na Research Society and Development
(Fator de impacto: 1.78)

O efeito dos exopolissacarídeos obtidos a partir de bactérias ácido lácticas como prebiótico: uma revisão sistemática

Artigo de revisão sistemática publicado em 2021 na Research Society and Development
(Fator de impacto: 1.78)

Research, Society and Development, v. 10, n. 8, e14610817259, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17259

Can postbiotics show antiviral effects against Sars-CoV-2?

Podem os pós-bióticos apresentarem efeitos antivirais contra Sars-CoV-2?

Pueden los postbióticos mostrar efectos antivirales contra Sars-CoV-2?

Received: 06/16/2021 | Reviewed: 06/22/2021 | Accept: 06/22/2021 | Published: 07/09/2021

Leandro Paes de Brito
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3440-6431
Universidade Federal de Pernambuco, Brazil
E-mail: leandropaes02ufpe@gmail.com
José Noé da Silva Júnior
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1385-932X
Universidade Federal de Pernambuco, Brazil
E-mail: silvajosejunior94@gmail.com
Priscila Danielly Santos de Barros
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1895-4780
Universidade Federal de Pernambuco, Brazil
E-mail: priscila.santos.barros@gmail.com
Elaine Cristina da Silva
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2395-7166
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil
E-mail: e.csilva2@outloo.com
Priscilla Régia de Andrade Calaça
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9092-6832
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil
E-mail: priscilla.calaca@hotmail.com
Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9573-6296
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil
E-mail: mtcvsoares@yahoo.com.br
Ana Lúcia Figueiredo Porto
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5561-5158
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil
E-mail: analuporto@yahoo.com.br

Abstract
Severe Acute Respiratory Syndrome of Coronavirus-2 (Sars-CoV-2) is the causative agent of the new Coronavirus Disease (COVID-19) responsible for the current pandemic that threatens global health. Although some anti-COVID-19 therapeutic agents are under investigation, there is still no evidence of antiviral action against Sars-CoV-2. Research in the literature describes the success of probiotics in the treatment of viral infections from their byproducts, known as postbiotics, such as exopolysaccharides, hydrogen peroxide, and different bacteriocins. Based on these reports, we describe the main postbiotics that present antiviral actions against different viruses with a view to suggesting their use as possible therapeutic agents for COVID-19. The revised data show promising effects for using postbiotics as efficient vehicles against various types of viruses. However, further investigation of the underlying mechanisms is required for their indication against Sars-CoV-2 and other Sars-CoV infections.
Keywords: Antiviral activity; COVID-19; New coronavirus; Probiotic.

Resumo
A Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus-2 (Sars-CoV-2) é o agente causador da nova Doença do Coronavírus (COVID-19) responsável pela atual pandemia que ameaça a saúde global. Embora alguns agentes terapêuticos anti-COVID-19 estejam sob investigação, ainda não há evidências de ação antiviral contra Sars-CoV-2. Pesquisas na literatura descrevem o sucesso dos probióticos no tratamento das infecções virais de seus subprodutos, conhecidos como pós-bióticos, como exopolissacarídeos, peróxido de hidrogênio e diversas bacteriocinas. Com base nesses relatos, descrevemos os principais pós-bióticos que apresentam ação antiviral contra diferentes vírus, com o objetivo de sugerir seu uso como possíveis agentes terapêuticos para COVID-19. Os dados revisados mostram efeitos promissores para o uso de pós-bióticos como veículos eficientes contra vários tipos de vírus. No entanto, uma investigação mais aprofundada dos mecanismos subjacentes é necessária para sua indicação contra Sars-CoV-2 e outras infecções por Sars-CoV.
Palavras-chave: Atividade antiviral; COVID-19; Novo coronavírus; Probióticos.

Resumen
El Síndrome Respiratorio Agudo Severo por Coronavirus-2 (Sars-CoV-2) es el agente causante de la nueva Enfermedad por Coronavirus (COVID-19) responsable de la pandemia actual que amenaza la salud global. Aunque se están investigando algunos agentes terapéuticos anti-COVID-19, todavía no hay evidencia de acción antiviral contra Sars-CoV-2. Los estudios en la literatura describen el éxito de los probióticos en el tratamiento de infecciones virales causadas por sus subproductos, conocidos como posbióticos, como exopolisacáridos, peróxido de hidrógeno y varias bacteriocinas. Con base en estos informes, describimos los principales post-bióticos que presentan acción antiviral frente a diferentes virus, con el objetivo de sugerir su uso como posibles agentes terapéuticos para COVID-19. Los datos revisados muestran efectos prometedores para el uso de postbióticos como vehículos eficientes contra varios tipos de virus. Sin embargo, se necesita más investigación de los mecanismos subyacentes para su indicación contra Sars-CoV-2 y otras infecciones por Sars-CoV.
Palabras clave: Actividad antiviral; COVID-19; Nuevo coronavirus; Probióticos.

1. Introduction

Recently the world is battling a pandemic caused by a new coronavirus, called Severe Acute Respiratory Syndrome of Coronavirus-2 (Sars-CoV-2) (Velev et al., 2020). Since the first case was reported in late 2019 in the city of Wuhan - China, "Coronavirus Disease-2019" (COVID-19) has spread across the world, and according to the World Health Organization, by June 15, 2021 the number of confirmed cases had reached 176.721.173 and the number of deaths caused by COVID-19 had risen to 3.821.283 (WHO, 2021).

To date, there are no specific therapeutic agents or vaccines available for COVID-19. In fact, several drugs are under investigation, but there is still no confirmation of antiviral activity for Sars-CoV-2 (Chen et al., 2020). Therefore, there is an urgent need to search for new potent and effective anti-COVID-19 agents in order to control or prevent infection with the new coronavirus.

Various studies in the literature describe the success of using probiotics in the therapy of viral infections both *in vitro* and *in vivo* (Ermolenko et al., 2018; Sunmola et al., 2019; Abdelhamid et al., 2019). Their antiviral action can occur through such mechanisms as: (I) direct probiotic-virus interaction, (II) stimulation of the immune system and (III) production of post-biotics with antiviral action (Drider et al., 2016). Hydrogen peroxide, lactic acid, exopolysaccharides and bacteriocins are examples of postbiotics that, among other activities, also act against several viruses (Al Kassaa et al., 2014).

Thus, based on reports in the literature on the antiviral efficiency of some postbiotics, our hypothesis is that these components may play an important role in COVID-19, and therefore may aid researchers to formulate an antiviral product that can inhibit or delay Sars-CoV-2 in humans.

2. Materials and Methods

This research is documentary in nature from analyzes of articles present and registered in the scientific literature. The articles considered eligible for inclusion in this research were those that presented original studies carried out with postbiotics and evaluated for their ability to inhibit the virus, and possibly against Sars-CoV-2, published in English, Spanish or Portuguese in the years of 2011 to 2021. Non-original articles were excluded (reviews, editorials, letters and comments). Electronic databases included in PubMed, Science Direct, LILACS, Scielo, Tripdatabase and Cochrane were used.

3. COVID-19 and Treatment Perspectives

Effective drugs or vaccines that can be used to prevent or mitigate the effects of Covid are still not available. Thus, some countries have adopted non-pharmacological, (NPI)-based intervention strategies to contain the virus and the transmission of the disease, such as by enforcing social distancing, self-isolation, quarantine and even lockdown (Di Grezia et

al., 2020). However, different classes of molecules have been reported, in the literature, regarding their potential against SARS-CoV-2.

3.1 Postbiotics: What do we Know About their Virucidal Potential?

Although the concept of probiotics indicates that microorganisms must be alive active to provide benefits to hosts, evidence suggests that microbial viability is not necessary to achieve such effects. Some proposals indicate that probiotic substances, known as postbiotics, can also benefit the health of the host (De Almada et al., 2017; Martín et al., 2019). These products can be short-chain fatty acids (SCFAs), microbial fractions, proteins or functional enzymes, secreted or extracellular polysaccharides (EPS) and teichoic and lipoteichoic acids (Markowiak et al., 2019), which have different actions, among which are anti-inflammatory, immunomodulatory, antioxidant and antimicrobial activity (Vallejo et al., 2020). However, the evidence on mechanisms of action by which these products exert their specific effects in certain systems or diseases has still not been completely elucidated (Barros et al., 2020; De Almada et al., 2016).

3.2 Exopolysaccharides

Exopolysaccharides (EPS) from probiotic lactic acid bacteria (LAB) are natural biopolymers composed of sugars and have been used for various applications, mainly for biological activities *in vitro* as well as *in vivo* (Freitas et al., 2011; Badel et al., 2011). Researchers have reported that this biological high-molecular long-chain polysaccharide can be a potential inhibitor of viral infection, especially in the systemic and respiratory. There follow examples of studies in which the EPS of probiotic bacteria has been used as agents against some known virus diseases.

Metabolites produced by *Lactobacillus plantarium* proved to be effective against Transmissible Gastroenterits Virus (TGVE) infection, a member of the Coronaviridae family (Yang et al., 2017). The authors observed a reduction of TGEV proliferation up to 78% by administering 1/4 dilution of a metabolic product of *L. plantarium*, and they later found that the major component of the metabolic product was EPS. Biliavska et al., (2019) reported that EPS produced by *Lactobacillus spp*. strain was capable of releasing the human adenovirus type 5 (HAdV-5) from cells after virus adsorption. Kim et al., (2018) investigated the effects of EPS from *L. plantarium* against rotavirus *in vitro* and in infected neonatal mice. They concluded that EPS displayed a high rate of adhesion and thus interfered with the rotaviral attachment to the cells *in vitro*. They reported that EPS decreased the rotavirus replication in the intestine of mice and reduced the symptoms after rotavirus infection: limited epithelial lesion, reduced episodes of diarrhea, and shortened the time to recovery of suckling mice. Nagai et al. (2011) found that mice infected by influenza virus and treated with yogurt and EPS of *L. delbrucki* and *L. bulgaricus* showed a decrease of influenza virus titer. Compared to groups treated with water, there was a significant increase of anti-influenza virus antibodies (IgA, IgG) in the bronchoalveolar lavage fluid at 4 days post-infection NK cell activity of splenocytes in both groups. According to Vivier et al. (2008) NK cells are important lymphocytes that play a crucial role in the defense against various virus infections. Thus, the authors concluded that yogurt fermented with EPS produced by *L. bulgaricus* can act on the immune system and protect against influenza virus infection.

Based on several studies, EPS therapy may be a candidate for reducing the severity of the COVID-19 infection or even for inhibiting the entrance of the virus into cells. According to Biliavska et al. (2019), bacterial exopolysaccharides show significant antiviral activity due to the degradation of the viral particles, a decrease in the titer of viruses, the blocking of viral DNA replication, and the release of the infectious virus particle. However, the antiviral mechanism of EPS has not been studied sufficiently. It is known that stimulation of the immune system occurs. *Lactobacillus* and its exopolysaccharides can stimulate the synthesis and accumulation of interleukin 12 to enhance the activity of natural killer cells and the synthesis of IgA. By activating the immune response and producing IgA, it was possible to decrease the influenza virus infection (Jung et

al., 2017). As shown, some probiotic strains such as from *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Streptococcus* with their EPS were indicated to show stronger therapeutic effect against several types of virus: adenovirus type 5, rotavirus, gastroenteritis corona virus and influenza virus (Biliavska et al., 2019; Kim et al., 2018; Yang et al., 2017).

3.3 Hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is an important substance in the metabolism of living organisms, produced by several bacteria including probiotics (Forman et al., 2008). According to Valko et al. (2007) oxidizing agents such as H_2O_2, represent a key element of the innate mammalian immune system and function in endosomal compartments to inactivate intracellular pathogens.

H_2O_2 plays an important role as a defense mechanism to prevent contamination by opportunistic microrganisms. The antiviral effects of H_2O_2 have been studied for a long time. Klebanoff et al. (1991) reported that *Lactobacillus* found in the vaginal environment can produce H_2O_2 as a natural microbicide that can be toxic to a number of viruses, including HIV and hsv-2. The authors observed that in vitro tests revealed the amount of H_2O_2 generated by 10^7 organisms was sufficient to inactivate HIV. Studies also demonstrated that H_2O_2 can be a means for producing viral vaccines. Amanna et al. (2012) developed a new vaccine based on H_2O_2 to inactivate viruses. They observed that neutralizing antibody and CD8+ T cell responses that were induced by H_2O_2 had an effective antiviral function. They concluded that H_2O_2 conferred protection against a range of viral pathogens and improved antigenicity and immunogenicity when compared to other standard approaches used for virus inactivation (formaldehyde and β-propiolactone).

Due to its antiviral activity and favorable safety profile, H_2O_2 from probiotic bacteria can be considered as antiviral candidates to be further evaluated against Sars-Cov-2 infection. To date, studies have only reported the effect of H_2O_2 as a virucidal agent for material and surface disinfection. For example, Ibáñez-Cervantes et al. (2020) reported that H_2O_2 was efficient at disinfecting N95 masks contaminated by Sars-Cov-2 and Kampf et al. (2020) found that 0.5% of H_2O_2 solution is effective at inactivating human coronaviruses such as Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East Respiratory Syndrome (MERS) on inanimate surfaces Kampf et al. (2020). However, the use of H_2O_2 in the nose, mouth and throat in a specific concentration is clearly indicated to enhance those local innate responses to viral infection against coronavirus (Caruso et al., 2020).

3.4 Bacteriocins

Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides by several lactic acid bacteria that have a bactericidal or bacteriostatic effect against related or unrelated bacteria (Al Kassaa et al., 2016) and potential for inhibition against several viruses. However, the repertoire of bacteriocins that have antiviral activity includes some that have been reported in several studies but the mechanisms of these bacteriocins are still little known (Aspri et al., 2016).

Bacteriocins synthesized by *Enterococcus durans* isolated from goat milk were evaluated for antiviral activity against herpes simplex virus 1 (HSV-1) and poliovirus (PV-1) in Vero cells (Cavicchioli et al., 2017). The authors observed that the bacteriocin GEn17 had the best percentage (71.6%) of HSV-1 inhibition, with a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of 24 µg / mL and a selectivity index (SI) of 17.8, while GEn09 showed the best antiviral performance against PV-1, reaching 92.2% inhibition, with IC_{50} of 22.2 µg / mL and SI of 25.8. These results indicate that the bacteriocins produced by *E. durans* proved to be effective in inhibiting this virus.

On the other hand, pediocin-like bacteriocin ST5Ha synthesized by *E. faecium* ST5Ha was active against HSV-1 virus with selectivity index 173 and IC_{50} of 50 µg/ mL in Vero cells (Todorov et al., 2010). A non-cytotoxic bacteriocin produced by

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus 1043 demonstrated virucidal activity against H7N7 and H7N1 influenza virus, with IC_{50} of 5.6 ng/ mL and 4.2 ng/ mL, respectively (Serkedjieva et al., 2000).

HSV-1 and HSV-2 show susceptibility to the peptide ST4V synthesized by *E. mundtii* ST4V in Vero cells of the kidney of the African green monkey in a dose-dependent manner with a 99.9% inhibition percentage of the two viruses at an IC_{50} value of 400 µg/ mL (Todorov et al., 2005).

The results reported by Wachsman et al. (2003) also indicate that enterocin CRL35 by *E. faecium* showed antiviral activity with an IC_{50} value of 15 µg/ mL against HSV-2 in Vero cells. They also point out that this virucidal activity may be due to inhibition of late protein synthesis such as extracellular D-glycoprotein responsible for viral assembly, since 25 µg/ mL of CRL35 was able to reduce 65% of the production of this protein.

The anti-influenza activity of enterocin-B by *E. faecium* L3 was also assessed and its IC_{50} of 5 µg/ mL caused 100% inhibition of H3N2 virus reproduction and 33% inhibition of H1N1 virus in the MDCK cell line. Likewise, when this strain of *E. faecium* L3, at a dose of 1 x 10^7 CFU, was evaluated for the health and survival of mice affected by H1N1 influenza viral infection, 20% of the mice in the experimental group recovered in contrast with the group without the probiotic all of which died (Ermolenko et al., 2018).

Recently, metabolites of *Lactobacillus plantarum* from the plantaricin category were selected to design an antiviral computational product to slow, inhibit or kill the new Sars-CoV-2. Plantaricin was able to bind tightly by blocking RdRp (RNA-dependent RNA polymerase), the residual binding domain (RBD) of spike protein S and ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) with binding energies -14,7, -11.1 and -12.7, respectively (Anwar et al., 2020).

4. Final Considerations

We have reported on postbiotics with antiviral effects found in the literature. Several research groups have reported the promising effects of postbiotics as an efficient vehicle against several types of viruses. However, further investigation of the underlying mechanisms is required. As no therapeutic agents for COVID-19 have as yet been approved, there is an urgent need to investigate bioproducts such as postbiotics and to test them on their own or combined with probiotic strains against the current COVID-19 and other CoV infections.

References

Abdelhamid, A. G., El-masry, S. S., & El-dougdoug, N. (2019). Probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains possess safety characteristics, antiviral activities and host adherence factors revealed by genome mining. *Epma Journal*.; (10): 350-337. https:// 10.1007 / s13167-019-00184-z

Al kassaa. I., Hober, D., Hamze, M., Chihib, N. E., & Drider, D. (2014). Antiviral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Probiotic and antimicrobial proteins*; (6): 185-177.

Al Kassaa, I. (2016). New insights on antiviral probiotics: From Research to Applications. *Springer*; 126-1.

Amanna, I. J., Raué, H. P., & Slifka, M. K. (2012). Development of a new hydrogen peroxide–based vaccine platform. *Nature Medicine*; (18): 979-974. https:// 10.1038 / nm.2763

Anwar, F., Altayb, H. N., Al-Abbasi, F. A., Al-Malki, A. L., Kamal, M. A., & Kumar, V. (2020). Antiviral effects of probiotic metabolites on COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*; 39: (5), 1-11. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1775123

Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., & Papademas, P. (2016). Raw donkey milk as a source of Enterococcus diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*; (73): 90-81. https://10.1016/ j. foodcont.2016.05.022

Badel, S., Bernard, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances;* (29): 66-54. https:// 10.1016 / j. biotechadv.2010.08.011

Barros, C. P., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., & et al. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: Concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science.; (*32): 8-1.

Biliavska, L., Pankivska, Y., Povnitsa, O., & Zagorodnya, S. (2019). Antiviral activity of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of the genera *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* against human adenovirus type 5. *Medicina.* 2019; (55): 519. https:// 10.3390 / medicina55090519

Caruso, A. A., Del Prete, A., & Lazzarino, A. I. (2020). Hydrogen peroxide and viral infections: a literature review with research hypothesis definition in relation to the current covid-19 pandemic. *Medical Hypotheses*: 109910. https://10.1016/ j. mehy.2020.109910

Cavicchioli, V. Q., Carvalho, O. V., Paiva, J. C., Todorov, S. D., Júnior, A. S., & Nero L. A. (2017). Inhibition of Herpes simplex virus 1 and Poliovirus (PV-1) by bacteriocins from *Lactococcus lactis subsp. lactis* and *Enterococcus durans* strains isolated from goat milk. *International Journal of Antimicrobial Agents*; (51): 37-33. https:// 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.020

Chen, L., Xiong, J., Bao, L., & Shi, Y. (2020). Convalescent plasma as a potential therapy for Covid-19. *Lancet infectious dis*.; (20): 400-398. https:// 10.1016 / S1473-3099 (20) 30141-9

De Almada, C. N., Almada, C. N., Martínez, R. C. R., & Sant'Ana, A. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science & Technology*.; (58): 114-96. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.011

De Almada, C. N., Almada, C., & Souza, S. A. (2017). Probiotics and prebiotics in animal health and food safety. *Springer*: 268-247.

Di Grezia, M., Fransvea, P., Santullo, F., & et al. (2020). Intra-abdominal hypertension as a trigger of "gut failure" is Sars- Cov-2 infection: effect of open abdomen (OA) and negative pressure therapy (NPT) on respiratory and gastrointestinal (GI) function. *Medical Hypotheses*; (144): 109954. https:// 10.1016 / j.mehy.2020.109954

Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., & Chikindas, M. (2016). Bacteriocins: not only antibacterial agents. *Probiotics antimicrobial proteins*; (8): 182-177. https:// 10.1007 / s12602-016-9223-0

Ermolenko, E. L., Desheva, Y. A., Kolobov, A. A., Kotyleva, M. P., Sychev, I. A., & Suvorov, N. A. (2018). Anti–Influenza Activity of Enterocin B In vitro and Protective Effect of Bacteriocinogenic Enterococcal Probiotic Strain on Influenza Infection in Mouse Model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*; (11): 712-705. https:// 10.1007 / s12602-018-9457-0

Forman, H. J. (2008). Hydrogen peroxide: the good, the bad, and the ugly. In: Oxidants in Biology. *Springer*.,1-17.

Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*; (29): 398-388. https:// 10.1016 / j. tibtech.2011.03.008

Ibáñez-Cervantes, G., Alcántara, J. C. B, & Cortés, A. S. N. (2020). Disinfection of N95 masks artificially contaminated with SARS-CoV-2 and ESKAPE bacteria using hydrogen peroxide plasma: impact on the reutilization of disposable devices. *American Journal of Infection Control*; (9): 1041-1037. https://10.1016/j. ajic.2020.06.216

Jung, Y. J., Lee, Y. T., & Ngo, V. L. (2017). Heat-killed *Lactobacillus casei* confers broad protection against influenza A virus primary infection and develops heterosubtypic immunity against future secondary infection. *Scientific reports; (*7): 12-1.

Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S., & Steinmann, E. (2020). Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection* (104): 251-246. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022

Kim, K., Lee, G., & Thanh, H. D. (2018). Exopolysaccharide from Lactobacillus plantarum LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response. *Journal of Dairy Science*. (7): 5712-5702. https:// 10.3168 / jds.2017-14151

Klebanoff, S. J., & Coombs, R. W. (1991). Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *The Journal of Experimental Medicine*; (174): 292-289. https://10.1084/ jem.174.1.289Zx

Markowiak, P., & Slizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients; (*9): 1–30. https:// 10.3390 / nu9091021.

Martín, R., & Langella, P. (2019). Emerging health concepts in the probiotics field: Streamlining the definitions. *Frontiers in Microbiology*. (10): 1047. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01047

Nagai, T., Makino, S., Ikegami, S., Itoh, H., & Yamada, H. (2011). Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. *International Immunopharmacology*. (11): 2250-2246. https://10.1016/ j. intimp.2011.09.012

Serkedjieva, J., Danova, S., & Ivanoma, I. (2000). Anti-influenza vírus activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology; (*88): 299-285.

Sunmola, A. A., Ogbole, O. O., Faleye, T. O., Adetoye, A., & Adeniji, J. Á. (2019). Antiviral potentials of *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus amylovorus* and *Enterococcus hirae* against selected enterovirus. *Folia microbiológica;* (10): 265-257. https:// 10.1007/s12223-018-0648-6

Vallejo, C. B., Lópes, C. C., García, H. S., Córdova, A. F. G., & Mendoza, A. H. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: A review of current evidence and emerging trends. *Advances in Food and Nutrition Research*. (94): 384-1.

Todorov, S. D., Wachsman, M. B., Knoetze, H., Meincken, M., & Dicks, L. M. T. (2005). An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *International Journal of Antimicrobial Agents*. (25): 513-508. https:// 10.1016 / j. ijantimicag.2005.02.005

Todorov, S. D., Wachsman, M., & Tomé, E. (2010). Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*. (27): 879-869. https:// 10.1016 / j.fm.2010.05.001

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.;* (39): 84-44. https:// 10.1016 / j. biocel.2006.07.001

Velev, V., Popov, M., Velikov, P., Dinkova, M., Ilieva, V., & et al. (2020). Covid-19 and gastrointestinal injury: a brief systematic review and data from Bulgaria. *Le infezioni in medicin*a; 41-37.

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*. (9): 510-503.

Wachsman, M., Castilla, V., Holgado, A. P. R., Torres, R. A., Sesma, F., & Coto, C. E. (2003). Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. *Antiviral Research*. (58): 24-17. https:// 10.1016 / s0166-3542 (02) 00099-2.

World Health Organization. (2021). Questions and answers on coronaviruses (COVID-19). https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-coronaviruses (accessed Sept 8, 2020).

Yang, Y., Song, H., Wang, L. & et al. (2017). Antiviral effects of a probiotic metabolic products against transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Prob Health*.; (3): 6-1. https:// 10.4172/2329-8901.1000184

Research, Society and Development, v. 10, n. 15, e194101522547, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22547

O efeito dos exopolissacarídeos obtidos a partir de bactérias ácido lácticas como prebiótico: uma revisão sistemática

The effect of exopolysaccharides obtained from lactic acid bacteria as a prebiotic: a systematic review

El efecto de los exopolisacáridos obtenidos a partir de bacterias del ácido láctico como prebiótico: una revisión sistemática

Recebido: 30/10/2021 | Revisado: 07/11/2021 | Aceito: 14/11/2021 | Publicado: 24/11/2021

Rejane Gonçalves Monteiro
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1716-5675
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: rejane_bio@hotmail.com
Elaine Cristina da Silva
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2395-7166
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: e.csilva2@outlook.com
Anna Larissa Cerqueira Martins
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0141-1314
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: annalarissa01@gmail.com
Ana Lúcia Figueiredo Porto
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5561-5158
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: analuporto@yahoo.com
Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9573-6296
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail:mtcvsoares@yahoo.com

Resumo
Exopolissacarídeos de bactérias ácido láticas são biopolímeros conhecidos pela diversidade estrutural e devido a isto eles apresentam vários efeitos benéficos a saúde humana, podendo atuar como imunomoduladores, antioxidantes, antitumorais etc. Sabe-se que os exopolissacarídeos também auxiliam no equilíbrio da microbiota intestinal, porém ainda não há constatação de que seja por efeito prebiótico. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar o desempenho dos exopolissacarídeos produzidos por Bactérias ácido láticas como prebióticos por meio de uma revisão sistemática de literatura. A revisão foi realizada adotando a estratégia PRISMA. Foram coletados estudos realizados entre 2011 e 2020, utilizando 4 diferentes bases de dados. As palavras chaves empregadas foram: "exopolysaccharides", "prebiotics", "prebiotic potential", "prebiotic effects", "lactic acid bacteria" e "probiotics". Foram analisadas ao todo, 7 referências relativas aos efeitos prebióticos de EPS em geral, e destes poucos realizaram estudos clínicos randomizados e controlados. Embora os EPS estudados tenham apresentado características típicas de um prebiótico, ainda há a necessidade de estudos futuros com melhor delineamento experimental para verificar com maior precisão esses efeitos, bem como a determinação da duração e dosagens adequadas.
Palavras-chave: Bactéria ácido lática; Exopolissacarídeo; Prebiótico.

Abstract
Exopolysaccharides from lactic acid bacteria are biopolymers known for their structural diversity and because of this they have several beneficial effects on human health, and can act as immunomodulators, antioxidants, antitumors etc. It is known that exopolysaccharides also help in the balance of the intestinal microbiota, but there is still no evidence that it is due to a prebiotic effect. Therefore, this study aimed to evaluate the performance of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria as prebiotics through a systematic literature review. The review was carried out adopting the PRISMA strategy. Studies carried out between 2011 and 2020 were collected, using 4 different databases. The key words used were: "exopolysaccharides", "prebiotics", "prebiotic potential", "prebiotic effects", "lactic acid bacteria" and "probiotics". A total of 7 references were analyzed regarding the prebiotic effects of EPS in general, and of these few, randomized and controlled clinical studies were carried out. Although the EPS studied have presented typical characteristics of a prebiotic, there is still a need for future studies with a better experimental design to verify these effects with greater precision, as well as to determine the appropriate duration and dosages.
Keywords: Lactic acid bactéria; Exopolysaccharide; Prebiotic.

Resumen
Los exopolisacáridos de las bacterias del ácido láctico son biopolímeros conocidos por su diversidad estructural y por ello tienen varios efectos beneficiosos sobre la salud humana, pudiendo actuar como inmunomoduladores, antioxidantes, antitumorales, etc. Se sabe que los exopolisacáridos también ayudan en el equilibrio de la microbiota intestinal, pero aún no hay evidencia de que se deba a un efecto prebiótico. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo evaluar el desempeño de los exopolisacáridos producidos por las bacterias del ácido láctico como prebióticos a través de una revisión sistemática de la literatura. La revisión se realizó adoptando la estrategia PRISMA. Se recogieron estudios realizados entre 2011 y 2020, utilizando 4 bases de datos diferentes. Las palabras clave utilizadas fueron: "exopolisacáridos", "prebióticos", "potencial prebiótico", "efectos prebióticos", "bacterias del ácido láctico" y "probióticos". Se analizaron un total de 7 referencias sobre los efectos prebióticos de los SEP en general, y de estos pocos se realizaron estudios clínicos aleatorizados y controlados. Si bien los EPS estudiados han presentado características típicas de un prebiótico, aún se necesitan estudios futuros con un mejor diseño experimental para verificar estos efectos con mayor precisión, así como para determinar la duración y dosis adecuadas.
Palabras clave: Bacterias del ácido láctico; Exopolisacárido; Prebiótico.

1. Introdução

Os exopolissacarídeos (EPS) produzidos por Bactérias Ácido Láticas (BAL) possuem características físico-químicas, através das quais proporcionam melhorias nas texturas e nas propriedades organolépticas melhorando a qualidade do produto fabricado nas indústrias alimentícias, de cosméticos, entre outras (Lynch, et al., 2018).

Para a indústria, os EPS são de grande interesse comercial, pois ajudam na purificação ao final dos bioprocessos, possuem propriedades físico-químicas reprodutíveis, além de existirem em grande abundância (Jindal, Singh & Khattan, 2018). Também são considerados essenciais fontes de hidrocolóides (gomas alimentares) por proporcionar estrutura e estabilidade quando aplicados na produção de alimentos (Gao, et al., 2017).

Existem muitas aplicações industriais potenciais para EPS originado por BAL, como seu papel como gelificante, espessantes, emulsificantes, estabilizantes, aglutinantes de água e agentes viscosificantes. Além disso, o EPS produzido pela BAL tem um papel potencial na preparação de produtos lácteos e à base de cereais (Daba, Elnahas & Elkhateeb, 2021).

No âmbito de reologia, os EPS influenciam na capacidade de biopolímero, pois dão maior uniformidade na estrutura química do composto, considerando o tamanho e a frequência das ramificações e a massa molecular (Zhou, et al., 2018). Podem ter ação prebiótica, propriedade esta, que ainda se encontra em estudo para garantir sua eficácia (Caggianiello, et al., 2016).

A ação prebiótica diz respeito ao crescimento de forma seletiva de microrganismos benéficos da microbiota intestinal assim como de probióticos. A modulação dessa microbiota, e a inclusão de probióticos na dieta, podem ser aproveitadas em terapias alternativas para a prevenção e tratamento de doenças (Arora, Green & Prakash, 2020; Carmo, 2019) e vêm se tornando cada vez mais comum nos suplementos alimentícios para favorecer a saúde em geral dos seres humanos (Renschler, et al., 2020).

Assim, o objetivo dessa revisão sistemática foi investigar o uso de exopolissacarídeos produzidos a partir das bactérias ácido láticas como prebióticos.

2. Metodologia

2.1 Diretrizes

Esta revisão sistemática seguiu às diretrizes determinadas pelo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). (Moher, et al., 2009).

2.2 Critérios de elegibilidade

Os artigos científicos selecionados para esta revisão sistemática foram aqueles que desenvolviam estudos primários, publicados em língua inglesa nos últimos 10 anos, 2011 a 2020, que associaram a administração de exopolissacarídeo produzidos por Bals com ação prebiótica em ensaios in vitro. Foram excluídos da revisão sistemática artigos de estudo secundário (revisões, relatórios e livros) e duplicados, assim como estudos que não possuíam todos os critérios de elegibilidade, tais como: ensaios in

vivo, que não utilizaram o exopolissacarídeo como prebiótico em teste.

2.3 Estratégias de pesquisa e identificação do estudo

A seleção dos artigos foi realizada por três revisores que o fizeram de forma independente, tomando como base três etapas: título, seguida de resumo e por fim o texto completo, a fim de verificar os critérios de elegibilidade. Na pesquisa de dados as seguintes palavras-chave foram utilizadas: "*exopolysaccharides*", "*prebiotics*", "*prebiotic potential*", "*prebiotic effects*", "*lactic acid bacteria*" e "*probiotics*". Para obter maior alcance dos resultados, os termos foram interligados com a inserção dos operadores "*or*" e "*and*". Devido a heterogeneidade dos estudos selecionados e qualidade do ensaio, não foi feita uma meta-análise, logo os resultados foram resumidos em texto.

3. Resultados e Discussão

3.1 Artigos pesquisados

Na Figura 1 encontra-se um fluxograma para melhor entendimento do processo de seleção dos trabalhos. Onde, podemos observar que dos 487 artigos, inicialmente obtidos nas bases de dados Pubmed/ Medline/Web of science/ Scopus /Science Direct, a partir da utilização dos critérios de seleção e elegibilidade, restaram 7 artigos que passaram por uma leitura cuidadosa.

Figura 1: Fluxograma de identificação e seleção dos artigos para revisão sistemática sobre o efeito prebiótico de exopolissacarídeos, 2011-2020.

Fonte: Autores (2020).

Este fluxograma traz informações de como se deu a pesquisa da revisão sistemática de forma sucinta seguindo os critérios para a seleção dos estudos apresentados usando os protocolos para a realização da revisão sistemática.

Os artigos incluídos analisaram a influência dos exopolissacarídeos com ação prebiótica na microbiota intestinal em ensaios in vitro. Na Tabela 1 tem-se um compilado de informações relevantes sobre os artigos analisados e os pontos principais para análise desse efeito prebiótico do EPS.

Tabela 1: Dados avaliados nos artigos utilizados neste estudo.

Referências	Microrganismos produtores de EPS	EPS	Carboidrato padrão para crescimento dos probióticos	Concentração do EPS como prebiótico	Produção de ácido graxo	Tempo de crescimento dos microrganismos probióticos	Resultados (Efeito Prebiótico)
Liu *et al*., (2020)	*Erwinia sp. 10119*	Levana	Inulina	NR	Aumento do acetato e do butirato, respectivamente, de 14.16 mM para 30.37 mM e de 26.03 mM para 65.41 mM.	48h	A levana influenciou no crescimento da população de *Bifidobacterium, mas* não houve mudança significativa na população de *Lactobacillus*.
Tang *et al.*, (2020[1])	*Lactobacillus delbrueckii ssp. e Lactobacillus bulgaricus.*	NR	Inulina	1%	Ao final das 48h de fermentação, o total de AGCC de r-eps 1, r-eps 2 e inulina foram, respectivamente, 145 mM, 135mM e 130 mM.	48h	Os EPSs testados apresentaram forte efeito prebiótico em comparação ao padrão.
Tang *et al.*, (2020[2])	*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*	NR	Inulina e Glicose	NR	NR	48h	Não foi observado crescimento de *Bifidobacterium.*
Hussein *et al.*, (2015)	*Lactobacillus delbrueckii bulgaricus, Lactobacillus helveticus e Lactobacillus casei*	NR	NR	NR	NR	24h, 48h, 72h, 96h, 120 h	Maior efeito prebiótico com o EPS de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus.*
Das *et al.*, (2014)	*Lactobacillus plantarum DM5*	Glucano	Inulina	1%	NR	24h	Aumento significativo das populações de *Bifidobacterium Infantis* e *Lactobacillus. sp.*
Grosu-Tudor *et al.*, (2013)	*Lactococcus lactis, Leuconostoc citreum, Weissella confusa/cibaria, Streptococcus thermophilus*	NR	Lactose	5 g/L	A produção de acetato foi de 12 mM/L.	92h	Apenas os HoPs mostraram efeito bifidogênico.
Hongpattarakere *et al.*, (2012)	*Weissella cibaria, Weissella confusa,Lactobacillus plantarum e Pediococcus pentosaceus*	NR	Glicose	1%	Após 24 h de simulação, a produção de ácido acético foi de 10 L.	24h, 48h	O EPS de *Weissella cibaria* foi o substrato que estimulou o crescimento de *Bifidum bifido, de 6.17 para 7.54 log CFU/mL.*

NR: Não Referenciado. Fonte: Autores (2021).

Nesta tabela observa-se os resultados dos artigos analisados com suas respectivas informações relevantes para o estudo, como a produção de EPS e tempo de cultivo do microorganismo, produção de ácido graxos, fonte de carbono e efeito prebiótico.

3.2 Efeito prebiótico

A maioria dos estudos demonstram que o exopolissacarídeo tem efeito prebiótico devido ao seu efeito bifidogênico e ao estímulo do crescimento das bactérias ácido láticas, como *Lactobacillus spp.* (Hongpattarakere, et al., 2012; Das, et al., 2014; Tang, et al., 2020[1]).

De acordo com estudos avaliados foi observado a falta ou baixo estímulo do crescimento de bactérias patogênicas como *Clostridium* spp., *Escherichia coli* e Bacteroides com as suplementações de exopolissacarídeos aos meios de cultura. O não crescimento desses microrganismos sugere que o prebiótico serve como fonte de carbono apenas para probióticos, atingindo assim sua funcionalidade final (Hongpattarakere, et al., 2012; Grosu- Tudor et al., 2013; Das, et al., 2014; Liu, et al., 2020; Tang, et al., 2020[2]).

Foi identificado que os exopolissacarídeos que serviram como melhores fontes de carbono para bactérias probióticas foram os homopolissacarídeos, devido o mesmo ser resistente a passagem gastrointestinal e não sofrer degradações significativas, podendo-se dizer que possuem efeito de fibra (Grosu-Tudor, et al., 2013 e Tang, et al., 2020[1]). Entretanto, foi observado que heteropolissacarídeos formados por glicose e arabinose, produzidos por *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*, apresentam alto índice como prebiótico (Hussein, et al., 2015).

O estudo de Das, et al. (2014) é pioneiro na análise da ação prebiótica do g*lucano DM5* produzido a partir de *L. plantarum DM5*. O *glucano DM5* em comparação com a goma de guar, que já é muito utilizada na indústria, se mostra como bom biofloculante e emulsificante, por suportar altas temperaturas, ter uma boa retenção de água, e apresentar uma estrutura formada por polissacarídeos. Ele também estimula o crescimento de *L. plantarum DM5*, *L. acidophilus* NRRL B-4496 e *B. infantis* NRRL B-41661, em comparação com a inulina, que já é considerado prebiótico.

Foi analisado a taxa de crescimento de *Bifidobacterium* a partir de EPS produzidos por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1 (Tang, et al., 2020[1]; Hussein, et al., 2015), *Lactococcus lactis* (Grosu-Tudor, et al., 2013), *Weissella cibaria A2* (Hongpattarakere, et al., 2012) e *Erwinia* spp. 10119 (Liu, et al., 2020) e em todos os casos houve aumento populacional significativo, o que demonstra uma eficácia da ação prebiótica dos EPS produzidos por essas cepas.

Estudos que analisaram frações de exopolissacarídeos produzidas por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1 mostram sua eficiência como fontes de carbono para o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus*, como a *L. plantarum 70810* e a *L. casei* ssp. *rhamnosus LS-8*. Assim como conseguem reduzir o volume de células de *Escherichia coli* e não estimulam o crescimento de *Streptococcus thermophilus* (Tang, et al., 2020[2]).

3.3 Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os ácidos graxos de cadeia curta são essenciais para a saúde do hospedeiro, e por isso a avaliação de sua produção oriunda da fermentação de prebióticos se torna um fator importante na análise do potencial destes suplementos. Alguns exemplos da atuação dos AGCC no organismo são: o ácido butírico, que previne contra o câncer colo retal e é fonte de energia para a microbiota intestinal, o ácido propiônico que reduz a síntese de colesterol no fígado e aumenta o metabolismos de lipídeos e o ácido acético que é oxidado pelo coração (Maldonado-Contreras, et al., 2020; Gibson, et al., 2017).

A concentração de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente de ácido acético, foi um parâmetro avaliado nos resultados da suplementação de exopolissacarídeo como prebiótico, pois, esses são produzidos a partir da fermentação de fontes de carbono pela microbiota intestinal e, como supracitado, tem um grande fator de importância para a saúde do hospedeiro (Hongpattarakere, et al., 2012; Grosu- Tudor, et al., 2013; Liu, et al., 2020; Tang, et al., 2020[1]).

Grosu-Tudor, et al. (2013) relacionou a baixa produção de ácido acético, 12mM/litro, ao baixo crescimento de *Bifidobacterium* spp. o qual foi suplementado com exopolissacarídeo produzido por *Lactococcus lactis 1.8* após 24 horas.

Por fim, Tang, et al. (2020[1]) demonstrou o aumento da concentração de todos os ácidos graxos de cadeia curta (fórmico, acético, propiônico e butírico), após 48h de fermentação das frações de exopolissacarídeo obtidos *de L. delbruecckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1.

3.4 Degradação do exopolissacarídeo na simulação do sistema gastrointestinal

Tang, et al. (2020)[1] [2] verificaram, em ambos estudos, que após a simulação *in vitro* da digestão no sistema gastrointestinal, 2 frações de EPS (r-eps 2 e r-eps3) sintetizadas por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1 apresentaram redução de 13.4% e 10.6% das massas, respectivamente, ao mesmo tempo a fração r-eps1 apresentou insignificante variação, esta foi a que obteve melhores taxas de fermentação por bactérias probióticas.

No estudo realizado por Grosu-Tudor, et al. (2013), todos os seis exopolissacarídeos selecionados ao passarem pela simulação do trato gastrointestinal superior não sofreram degradação, tanto os homopolissacarídeos, quanto os heteropolissacarídeo.

Foi observado por Hongpattarakere, et al. (2012) baixa percentagem de degradação do EPS *W.cibaria A2* quando submetido a simulação gástrica intestinal. Já para Das, et al. (2014), os percentuais de digestão de exopolissacarídeo *Lactobacillus plantarum DM5* foram irrelevantes.

4. Discussão

Apesar do acelerado crescimento de conhecimentos e da literatura científica sobre microbiota intestinal e prebióticos, esta revisão sistemática mostrou que as informações são muito limitadas no que se refere ao potencial do EPS de agir como um prebiótico. Não foi encontrada nenhuma revisão sistemática sobre esse tema.

Nos trabalhos analisados não há uma homogeneidade nos microrganismos utilizados para análise da produção de EPS, assim, torna-se difícil comparar os resultados e as diferenças na microbiota intestinal em cada estudo analisado.

Foi observado que os homopolissacarídeos (HOPS) apresentaram melhores resultados no estímulo do crescimento de bactérias não patogênicas *Bifidobacterium bifidum*, exceto os produzidos por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, que não apresentaram desenvolvimento de *Bifidobacterium bifidum* nos seus resultados.

Em todos os estudos, não houve degradação significativa dos EPSs homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos que foram submetidos à simulação gastrointestinal. Isso se deve ao fato desses EPS possuírem efeito de fibra, ou seja, nenhum deles foi degradado durante a simulação pela passagem no sistema gastrointestinal, e com isso, eles podem atingir cólon sem serem hidrolisados ou absorvidos na parte superior do trato gastrointestinal (Grosu-Tudor, et al., 2013).

É importante a avaliação da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) oriundos da fermentação de prebióticos, pois é um fator essencial para qualificar o potencial destes suplementos, visto que eles auxiliam na saúde do hospedeiro, como na criação de uma barreira para substâncias nocivas, assim como na redução de inflamação e de risco de câncer no intestino (Gibson, et al., 2017).

Entretanto, apesar dos estudos mostrarem que houve produção de ácido graxo, essa quantidade não foi especificada, e os trabalhos de Grosu-Tudor et al. (2013) e Hussein et al. (2015), não expõem se houve produção. Logo, não é possível chegar a uma conclusão em como de fato esse parâmetro interferiu nos estudos analisados.

As diferentes metodologias empregadas para a análise da ação prebiótica do EPS na microbiota intestinal dos ensaios estudados e as diferentes espécies de bactérias avaliadas inviabilizaram a determinação de um padrão específico que garanta a eficiência da ação prebiótica do EPS em sua totalidade.

Outros aspectos que dificultam a comparabilidade dos resultados obtidos são a variabilidade das fontes de carbono utilizadas nos estudos. Porém, se observa que os trabalhos que usaram como fonte de carbono a sacarose, a produção de EPS foi muito significativa, então sugere-se que em futuros trabalhos a sacarose seja utilizada como única fonte de carbono.

Diante da heterogeneidade dos ensaios *in vitro*, evidencia-se a necessidade de padronização dos critérios e definições utilizados para permitir a comparação entre os microrganismos e sua produção de EPS, conforme mencionado na literatura. Portanto, independentemente das análises realizadas, não pode-se afirmar apenas com esses trabalhos que o EPS possui ação prebiótica em todos os casos.

5. Conclusão

A presente revisão sistemática constatou que EPS produzido por BAL apresentou influência no crescimento de Bifidobactérias assim como em cepas de bactérias ácido láticas probióticas, tais como as do gênero *Lactobacillus.* Tal influência não foi observada para o crescimento de bactérias não probióticas e patogênicas. Além disso, alguns do EPS testados possuem baixa degradação frente a passagem no sistema gastrointestinal. Com isso, o presente estudo sugere a incorporação de EPS em alimentos funcionais com o título de prebiótico, porém existe a necessidade de mais estudos para confirmar o tipo de EPS, duração do efeito e a dose de suplementação, a fim de aumentar as evidências dos resultados descritos pelos estudos.

Referências

Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., Sanni, A. I., & Banwo, K. (2018). Production of exopolysaccharide by strains of Lactobacillus plantarum YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage. *PeerJ INC*. 6, e5326. 10.7717/peerj.5326

Arora, K., Green, M., & Prakash, S. (2020). The Microbiome and Alzheimer's Disease: Potential and Limitations of Prebiotic, Synbiotic, and Probiotic Formulations. Front. *Bioeng. Biotechnol*. 8:537847. 10.3389/fbioe.2020.537847

Caggianiello, G., Kleerebezem, M., & Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(9), 3877–3886. 10.1007/s00253-016-7471-2

Daba, G. M., Elnahas, M. O., & Elkhateeb, W. A. (2021). Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules.* 173, 79–89. 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.110

Das, D., Baruah, R., & Goyal, A. (2014). A food additive with prebiotic properties of an α-d-glucan from Lactobacillus plantarum DM5. *International Journal of Biological Macromolecules.* 69, 20–26. 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.029

Gao, Z., Fang, Y., Cao, Y., Liao, H., Nishinari, K., & Phillips, G. O. (2017). *Hydrocolloid-food component interactions. Food Hydrocolloids.* 68, 149–156. doi 10.1016/j.foodhyd.2016.08.042

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 14, 491-502. 10.1038/nrgastro.2017.75

Grosu-Tudor, S. S., Zamfir, M., Meulen, R. V. D., Falony, G., & Vuyst, L. D. (2013). Prebiotic potential of some exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Romanian Biotechnological Letters.* 18 (5), 8666-8676. https://www.researchgate.net/publication/286068292_Prebiotic_potential_of_some_exopolysaccharides_produced_by_lactic_acid_bacteria

Guarner, F., Sanders, M. E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A. G., Kim, N., Paula, J. A. de., Ramakrihna, B., Shanahan, F., Szajewska, H., Thomson, A., & Mair, A. L. (2017). Probiotics and prebiotics. World gastroenterology organization. https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-english-2017.pdf

Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., & Rastall, R. A. (2012). In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846–852. 10.1016/j.carbpol.2011.08.085

Hussein, M. M., Ghaly, M. F., OSMAN, M. Y., Shalaby, A. S. G., & Helal, M. M. I. (2015). Production and prebiotic activity of exopolysaccharides derived from some probiotics. *Egyptian Pharmaceutical Journal.* 14(1), 1. 10.4103/1687-4315.154687

Jindal, N. & Khattar, S. J. (2018). Microbial Polysaccharides in Food Industry. *Biopolymers for Food Design*, 95-123. 10.1016 / b978-0-12-811449-0.00004-9

Liu, C., Kolida, S., Charalampopoulos, D., & Rastall, R. A. (2020). An evaluation of the prebiotic potential of microbial levans from Erwinia sp. 10119. *Journal of Functional Foods*. 64, 103668. 10.1016/j.jff.2019.103668

Lybch, K. M, Coffey, A., & Arendt, E. K. (2018). Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their technofunctional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International.* 110, 52-61. 10.1016/j.foodres.2017.03.012

Maldonado-Contreras, A., Noel, S. E, Ward, D. V, Velez, M., & Mangano, K. M. (2020). Associations between Diet, the Gut Microbiome, and Short-Chain Fatty Acid Production among Older Caribbean Latino Adults. *Journal of the academy of nutrition and dietetics*. 112(120), 2047-2060. 10.1016 / j.jand.2020.04.018

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D. G. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS medicine.* 62 (10), 1006–1012. 10.1016 / j.jclinepi.2009.06.005

Renschler, M. A., Wyatt, A., Anene, N., Robinson-Hill, R., Pickerill, E. S., Fox, N. E., Griffith, J. A., & McKillip, J. L. (2020). Using nitrous acid-modified de Man, Rogosa, and Sharpe medium to selectively isolate and culture lactic acid bacteria from dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 103(2). 10.3168/jds.2019-17041

Tang, W., Zhou, J., Xu, Q., Dong, M., Fan, X., Rui, X., Zhang, Q., Chen, X., Jiang, M., Wu, J., & Li, W. (2020[1]). In vitro digestion and fermentation of released exopolysaccharides (r-EPS) from Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus SRFM-1. *Carbohydrate Polymers.* 230, 115593. 10.1016/j.carbpol.2019.115593

Tang, W., Han, S., Zhou, J., Xu, Q., Dong, M., Fan, X., Rui, X., Zhang, Q., Chen, X., Jiang, M., Wu, J., & Li, W. (2020[2]). Selective fermentation of Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus SRFM-1 derived exopolysaccharide by Lactobacillus and Streptococcus strains revealed prebiotic properties. *Journal of Functional Foods.* 69, 103952. 10.1016/j.jff.2020.103952

Zhou, Q., Feng, F., Yang, Y., Zhao, F., Du, R., Zhou, Z., & Han, Y. (2018). Characterization of a dextran produced by Leuconostoc pseudomesenteroides XG5 from homemade wine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2234–2241. 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.098