



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**  
**CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**BRUNA MARQUES DE PAULA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE *BACILLUS***

**FORTALEZA**

**2019**

BRUNA MARQUES DE PAULA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE *BACILLUS*

Monografia apresentada ao Curso de Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Orientador didático-pedagógico: Prof. Dra. Ruth Maria Bonfim Vidal.

Orientador Profissional: Dra. Ana Iraidy Santa Brígida.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

D32p de Paula, Bruna Marques.

Produção e caracterização de exopolissacarídeos de *Bacillus* / Bruna Marques de Paula. –  
2019. 43 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de  
Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Ruth Maria Bonfim Vida.

1. Exopolissacarídeo. 2. *Bacillus* sp. 3. Fermentação. 4. Antioxidante. I. Título.

CDD 540

---

BRUNA MARQUES DE PAULA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE *BACILLUS*

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ruth Maria Bonfim Vidal (Orientadora Pedagógica)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>a</sup>. Ana Iraidy Santa Brígida (Orientadora Profissional)  
Embrapa Agroindústria Tropical

---

Msc. Wellinson Gadêlha Guimarães (Examinador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Júnior e Marileusa.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado força para chegar ao fim da graduação e por ter guiado o meu caminho para conhecer as pessoas maravilhosas que conheci ao longo desses 4 anos de curso.

Aos meus pais, Marileusa Marques de Almeida Paula e João Batista de Paula Júnior e, meus irmãos Amanda Marques, Lucas Marques e Ingrid Marques que tanto me apoiaram e me estimularam a alcançar minhas metas.

À minha melhor amiga Morgana Pereira Mitri e ao meu namorado Victor Rafael por todo apoio, força, amor e amizade durante esse e muitos outros momentos de minha vida.

À todos os integrantes da banca: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ruth Maria Bonfim Vidal, Msc. Wellinson Gadêlha Guimarães e Dr<sup>a</sup>. Ana Iraidy Santa Brígida pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Prof. Dra. Ana Iraidy Santa Brígida pela orientação, apoio e oportunidade de estágio.

À minha orientadora pedagógica, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ruth Maria Bonfim Vidal, pela excelente orientação e por todos os ensinamentos durante a minha graduação.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por todo o suporte e recursos que fizeram a diferença nesse trabalho.

Ao Victor Hugo, Samile Bezerra e todos os meus colegas da graduação que estiveram presentes e me ajudaram na minha caminhada universitária.

À Tayna Mendes, Jackellyne de Lima e todos os integrantes do Laboratório de Tecnologia da Biomassa com os quais compartilhei dias de grandes trabalhos, aprendizados e risadas. Bem como ao apoio dado a mim para desenvolver o presente trabalho.

À todos os professores que eu tive desde o ensino básico até a graduação, pelas enormes contribuições dadas a minha formação profissional e também pessoal.

“Não são nossos talentos que mostram aquilo que realmente somos, mas sim as nossas escolhas.” (Alvo Dumbledore).

## RESUMO

Os biopolímeros, extraídos via fermentação microbiológica, possuem uma vasta de gama de aplicação em diversos campos da indústria. A seleção de micro-organismos capazes de sintetizar esses compostos tem sido alvo de diversas pesquisas e as bactérias do gênero *Bacillus sp* já foram estudadas e relatadas como promissoras para a produção desses compostos. Diante disso o presente estudo objetivou produzir e caracterizar exopolissacarídeos de bacillus visando identificar cepas promissoras. A produção dos biopolímeros foi conduzida através do cultivo das bactérias *Bacillus pumilus* (RAB9), *Bacillus cereus* (CMIAT 186) e duas linhagens de *Bacillus stratosphericus* (RMIAT 109 e CMIAT 61), em meio de cultura à base de sacarose, extrato de levedura e sais minerais. As fermentações foram realizadas durante 72 horas sob agitação (200 rpm) a 30°C. O isolamento do biopolímero ocorreu por precipitação do sobrenadante obtido na fermentação com etanol anidro gelado na proporção de 3:1. A purificação do produto foi conduzida através de sucessivas lavagens e centrifugação do material com o citado solvente. Os grupos funcionais presentes no polissacarídeo foram elucidados a partir da espectroscopia da região do infravermelho. Foi realizada análise termogravimétrica (TGA) para o conhecimento de suas propriedades térmicas, sendo verificada uma temperatura de decomposição em torno de 160 °C. A análise de capacidade antioxidante por DPPH exibiu baixa capacidade de captação de radicais livres (para 300 µg mL<sup>-1</sup> de EPS mL<sup>-1</sup>, 2,34% foi a capacidade máxima obtida, observada para o EPS produzido por *Bacillus stratosphericus* CMIAT 186), porém nos dando perspectiva para realização de novos estudos. Os resultados das análises químicas, térmicas e biológicas comprovam que as diferentes linhagens de *Bacillus sp* estudadas no presente trabalho produzem exopolissacarídeo com características semelhantes que ainda não foram relatadas na literatura. Maiores estudos quanto à funcionalidades tecnológicas, uso de novos métodos de purificação e caracterizações complementares são necessários para avaliar o potencial de uso destes para indústria de alimentos, farmacêutica ou de cosméticos.

**Palavras-chave:** Exopolissacarídeo. *Bacillus sp*. Fermentação. Antioxidante.

## ABSTRACT

Biopolymers extracted via microbiological fermentation have a wide range of application in various fields of industry. The selection of microorganisms capable of synthesizing these compounds has been the subject of several researches and bacteria of the genus *Bacillus* sp have been studied and reported as promising for the production of these compounds. Thus, the present study aimed to produce and characterize bacillus exopolysaccharides aiming to identify promising strains. The production of the biopolymers was carried out by cultivating the bacteria *Bacillus pumilus* (RAB9), *Bacillus cereus* (CMIAT 186) and two strains of *Bacillus stratosphericus* (RMIAT 109 and CMIAT 61) in sucrose, yeast extract and mineral salts. Fermentations were performed for 72 hours under stirring (200 rpm) at 30 ° C. Isolation of the biopolymer occurred by precipitation of the supernatant obtained by fermentation with anhydrous ice-cold ethanol in a 3: 1 ratio. Purification of the product was conducted by successive washes and centrifugation of the material with said solvent. The functional groups present in the polysaccharide were elucidated from infrared spectroscopy. Thermogravimetric analysis (TGA) was performed to know its thermal properties, and a decomposition temperature around 160 ° C was verified. Antioxidant capacity analysis by DPPH showed low free radical uptake capacity (for 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  EPS  $\text{mL}^{-1}$ , 2.34% of the maximum obtained capacity observed for EPS produced by *Bacillus stratosphericus* CMIAT 186), but giving us perspective for further studies. The results of chemical, thermal and biological analyzes show that the different *Bacillus* sp strains studied in the present work produce exopolysaccharide with similar characteristics that have not been reported in the literature. Further studies on technological functionalities, the use of new purification methods and complementary characterizations are needed to evaluate their potential for use in the food, pharmaceutical or cosmetics industries.

**Keywords:** Exopolysaccharide. *Bacillus* sp. Fermentation. Antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estutura unitária (monômero) da goma xantana.....	17
Figura 2 – Estrutura da glucana com ramificação nas posições $\beta$ - (1,3) (1,6).....	19
Figura 3 – Fluxograma das etapas de manutenção ao preparo do inóculo.....	24
Figura 4 – Análise espectroscópica na região do infravermelho ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) utilizando-se pastilha de KBr contendo o biopolímero produzido pelas linhagens de <i>Bacillus sp</i> .....	30
Figura 5 – Análise espectroscópica na região do infravermelho ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) utilizando-se pastilha de KBr contendo o biopolímero produzido pela cepa de <i>Bacillus stratosphericus</i> (RMIAT 109).....	30
Figura 6 – Análise termogravimétrica (TGA) dos biopolímeros. (A) CMIAT 61, (B) RMIAT 109, (C) CMIAT 186, (D) RAB9.....	33
Figura 7 – Capacidade antioxidante dos exopolissacarídeos produzidos pelas linhagens de <i>Bacillus sp</i> .....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fontes usuais de alguns polissacarídeos.....	16
Tabela 2 - Composição do meio de manutenção e ativação das linhagens de <i>Bacillus sp...</i>	24
Tabela 3 - Composição do meio de produção das linhagens de <i>Bacillus sp.....</i>	25
Tabela 4 - Massa de exopolissacarídeo obtidas em diferentes volumes de meio para Erlenmeyer de 250mL .....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CNPAT	Embrapa Agroindústria Tropicais
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EPS	Exopolissacarídeo
ERRO	Especies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TGA	Análise Termogravimétrica

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	OBJETIVOS .....	15
2.1	Objetivo Geral .....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
3.1	Polissacarídeos microbianos .....	16
3.2	Produção de exopolissacarídeos .....	18
3.3	Produção de exopolissacarídeo por <i>Bacillus sp</i> .....	19
3.4	Caracterizações de exopolissacarídeos .....	20
3.4.1	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho – FTIR</i> .....	20
3.4.2	<i>Análise térmica – TGA</i> .....	21
3.4.3	<i>Análise da atividade biológica</i> .....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
4.1	Produção de exopolissacarídeos.....	23
4.1.1	<i>Micro-organismos</i> .....	23
4.1.2	<i>Formulações de meios..</i> .....	23
4.1.3	<i>Manutenção e ativação</i> .....	24
4.1.4	<i>Preparo do inóculo</i> .....	25
4.1.5	<i>Fermentação</i> .....	25
4.3	Extração e purificação do EPS .....	26
4.4	Caracterizações do EPS .....	26
4.4.1	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho – FTIR</i> .....	26
4.4.2	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i> .....	26
4.4.3	<i>Capacidade antioxidante por DPPH</i> .....	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1	Extração e purificação do biopolímero .....	29
5.2	Caracterizações do biopolímero .....	30
5.2.1	<i>Elucidação dos grupos funcionais presentes no composto</i> .....	30
5.2.2	<i>Análise termogravimétrica do biopolímero produzido</i> .....	32
5.2.3	<i>Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)</i> .....	34
6	CONCLUSÕES .....	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## 1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos são compostos poliméricos naturais amplamente encontrados na natureza que podem ser produzidos a partir de diversos organismos, incluindo animais, plantas, bactérias e algas (CUNHA et al., 2009). O avanço nas pesquisas biotecnológicas permitiu a descoberta de diversos biopolímeros, extraídos via fermentação microbiana, que possuem uma vasta gama de aplicação em diversos campos da indústria (CALAZANS et al., 1997).

Na indústria alimentícia, o destaque desses compostos deve-se principalmente às suas propriedades estabilizantes e gelificantes (PEREIRA et al., 2019). Na área da saúde, as propriedades de respostas biológicas e de defesa como: atividade antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória vêm ganhando destaque nas pesquisas desenvolvidas com esses compostos (WANG et al., 2013; MOHAMED et al., 2018). O ácido hialurônico, com seu efeito de antienvhecimento, e a celulose bacteriana, com sua propriedade de regeneração e hidratação da pele são exemplos de exopolissacarídeos aplicados na indústria de cosméticos e fármacos (LIU et al., 2011 ; FREITAS; ALVES; REIS, 2015).

Atualmente, têm-se observado uma contínua substituição dos polissacarídeos obtidos via fontes animais e vegetais por produtos de origem microbiana. Essa tendência deve-se devido algumas vantagens que os biopolímeros possuem, com relação às outras gomas, tais como: não dependência das condições climáticas, uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do micro-organismo utilizado, produção com custo e fornecimentos estáveis sob condições controladas (BUENO; GARCIA- CRUZ, 2006; ROSEIRO et al.,1994).

A seleção de micro-organismos capazes de sintetizar esses compostos em quantidade e com propriedades econômicas favoráveis tem sido alvo de diversas pesquisas. (DRUZIAN, 2000). Diversas linhagens de bactérias do gênero *Bacillus sp* já foram estudadas e relatadas como produtoras de biopolímeros. (KAWAI, 1992; HAN; CLARKE, 1990).

Nesse contexto, o presente trabalho busca produzir e caracterizar exopolissacarídeos produzidos por quatro variedades de *Bacillus* isoladas em solo nordestino. Os resultados dessa pesquisa servirão de base para a escolha dos micro-organismos mais promissores das condições de síntese para futuros trabalhos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Produzir e caracterizar exopolissacarídeos (EPS) de cepas de bactérias do gênero *Bacillus sp* visando identificar cepas promissoras.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar a quantidade produzida de EPS por cada cepa de *Bacillus sp* identificando as mais produtoras;
- Produzir o polissacarídeo em quantidades suficientes para a realização das análises químicas necessárias, nas condições definidas de meio de cultivo, inóculo, tempo de processo, aeração e temperatura;
- Caracterizar o biopolímero produzido pela bactéria utilizando testes espectroscópicos de FTIR, e análise termogravimétrica (TGA).
- Avaliar a capacidade antioxidante do EPS obtido para cada cepa;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Polissacarídeos microbianos

Polissacarídeos são macromoléculas naturais compostas por um grande número de monossacarídeos ligados entre si por ligações glicosídicas (PEREIRA et al., 2019). Aqueles com aplicações industriais podem ser extraídos de plantas, animais e fungos ou obtidos via fermentação microbiológica (CUNHA et al., 2009). Atualmente, há considerável interesse em polissacarídeos obtidos pela ação de micro-organismos. A xantana, dextrana e gelana são alguns exemplos de polissacarídeos de origem bacteriana (Tabela 1). Conhecidos como biopolímeros, estes polissacarídeos possuem a capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo quando aplicados em baixas concentrações (BORGES et al., 2004). Essa propriedade os tornou objeto de intensa pesquisa, tendo em vista o seu potencial de aplicação em vários setores industriais.

**Tabela 1** - Fontes usuais de alguns polissacarídeos

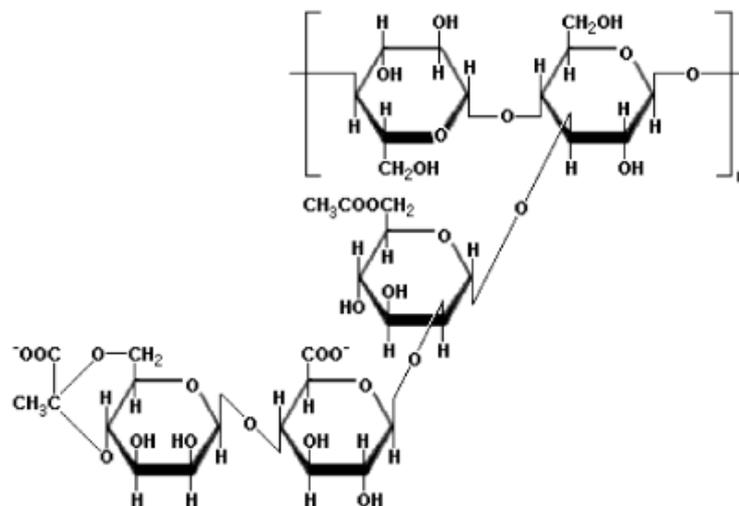
Origem	Polissacarídeo	Fonte
Bactérias	Xantana	<i>Xanthomonas ssp</i>
	Dextrana	<i>Leuconostoc spp</i>
	Gelana	<i>Sphingomonas elodea</i>
Fungos	Glucanas	<i>P. ostreatus, Agaricus blazei</i>
Exsudato de Plantas	Goma Arábica	<i>Acacia spp</i>
Tubérculo, cereais	Amido	milho, trigo, batatas
	Inulina	chicória, <i>Jerusalem artichokes</i>
Animais	Heparina	pulmão de bovinos e intestinos de porcos
	Quitina	carapaças de crustáceos

Fonte: Cunha et al. (2009)

Industrialmente, a maior quantidade de polissacarídeos ainda é extraída de fontes animais e vegetais. Os polissacarídeos extraídos de plantas apresentam processos industriais bem estabelecidos e são relativamente baratos. Contudo, sua produção é dependente de condições climáticas e em larga escala pode gerar grande impacto ambiental. Com isso, tem-se observado uma contínua substituição dos polissacarídeos obtidos dessas fontes convencionais por produtos de origem microbiana. Essa tendência deve-se as propriedades e características funcionais dos biopolímeros, somadas as vantagens de produção independente das condições climáticas, sob condições controladas com custo e fornecimentos estáveis. (BUENO; GARCIA-CRUZ, 2006) (ROSEIRO et al., 1994).

Os polissacarídeos possuem uma ampla gama de aplicações, especialmente nas áreas de alimentos, biomédicas, farmacêuticas e de cosméticos. Na indústria de alimentos, os biopolímeros microbianos podem ser utilizados como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes e gelificantes (PEREIRA et al., 2019). Contudo, a obtenção desses compostos para consumo humano é uma tarefa complexa, visto que os mesmos devem ser considerados completamente seguros do ponto de vista alimentar e, portanto, satisfazer as severas legislações alimentares em vigor. Atualmente, apenas quatro biopolímeros são aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso alimentar: xantana, gelana, curdulana e dextrana (PORTILHO, 2002). Na legislação brasileira, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a dextrana, xantana e gelana são utilizadas como aditivo alimentar.

**Figura 1** – Estrutura unitária (monômero) da goma xantana.



Fonte: Nery et al., (2008)

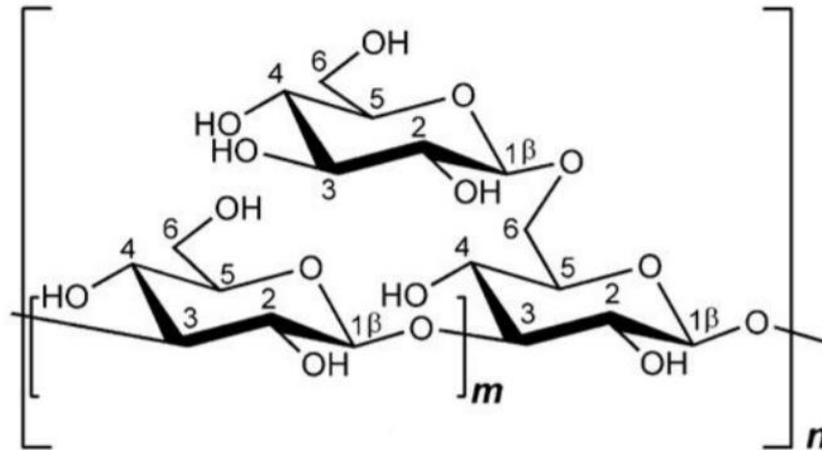
A seleção de micro-organismos que produzem polissacarídeos em quantidade e com propriedades econômicas favoráveis é um desafio que vem sendo enfrentado por vários grupos de pesquisa, apesar dos inúmeros avanços, poucos micro-organismos foram completamente estudados dentre a vasta gama de micro-organismos produtores de polissacarídeos, dos quais os fungos e as bactérias são os mais promissores (DRUZIAN, 2000).

### **3.2 Produção de exopolissacarídeos**

Os polissacarídeos microbianos são classificados segundo sua localização morfológica, podendo ser: intracelulares localizados no citosol; constituintes da parede celular (peptidoglicano); localizados externamente à parede celular formando uma rígida camada constituída de glicoproteínas e outros polissacarídeos; ou ainda um grupo sintetizado e secretado pela célula responsável por fornecer adesão e proteção para a mesma, os exopolissacarídeos (CERNING, 1995).

Além da localização morfológica, os polissacarídeos extracelulares podem ser classificados em homo ou heteropolissacarídeos. A dextrana e a glucana, exemplos de homopolissacarídeos, são formadas por cadeiras de polímeros de glicose com vários graus de ramificação (AQUINO, 2006). A estrutura da glucana é demonstrada na Figura 2. Os heteropolissacarídeos são formados por mais de um tipo de monossacarídeo, no caso da xantana, ilustrada na Figura 1, é composta por unidades repetidas de pentassacarídeos cujas unidades básicas são glicose, manose e ácido glucurônico, além de grupos piruvato e acetil (GARCIA-OCHOA et al., 2000)

**Figura 2** – Estrutura da glucana com ramificação nas posições  $\beta$ - (1,3) (1,6).



Fonte: Somensi (2014)

### 3.3 Produção de exopolissacarídeo por *Bacillus sp*

A produção de exopolissacarídeos é muito comum em diversos gêneros de bactérias promotores de crescimento vegetal. Esses polissacarídeos produzem efeitos em várias propriedades do solo e na produtividade da planta, apresentando relevância na interação bactéria-planta (Tiwari, Prasad e Lata, 2019). Dentre tais bactérias, o gênero *Bacillus* é formado por bactérias Gram-positivas aeróbias ou anaeróbias facultativas, em geral dotadas de mobilidade devido à presença de flagelos e que possuem a capacidade de produção de esporos, conferindo-lhe resistência a condições ambientais adversas. Este gênero inclui uma ampla gama de espécies, das quais poucas são patogênicas e as demais, despontam, preferencialmente, como microrganismos de importância industrial. Por este motivo, essas bactérias são muito estudadas sob os mais variados aspectos (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

Pode-se afirmar que bactérias promissoras quanto à produção industrial de biopolímeros, como as do gênero *Bacillus*, estão entre os residentes de solo mais abundantes e se destacam por apresentar a capacidade de crescer em variados ambientes (Tiwari, Prasad e Lata, 2019). Essa é uma razão pela qual diversos pesquisadores têm estudado linhagens desses micro-organismos visando conhecer sua produtividade e as propriedades dos polissacarídeos sintetizados.

Kawai (1992) e Isobe et al. (1992) constataram a produção de um exopolissacarídeo altamente viscoso pelo cultivo da linhagem *Bacillus circulans*, isolada do solo, em meio contendo glicose como fonte de carbono. Estudos realizados com as espécies *Bacillus subtilis* (EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997) e *Bacillus polymyxa* (HAN; CLARKE, 1990) comprovaram a produção de levana, polímero de frutose sintetizado através de reações de transfructosilação por muitas espécies de bactérias que tem aplicações na indústria de alimentos e em diversas áreas da saúde.

O estudo realizado com cepa de *Bacillus cereus* GU812900 revelou a produção de um exopolissacarídeo composto principalmente de açúcares naturais, proteínas, fosfatos e sulfatos. Foram feitas análises de FTIR para identificação dos grupos funcionais presentes no EPS e foi estudada a relação entre a taxa de corrosão de painéis de aço inoxidáveis e a concentração do exopolissacarídeo obtido (BRAGADEESWARAN et al., 2011).

### **3.4 Caracterizações de exopolissacarídeos**

#### **3.4.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho - FTIR**

Na literatura científica, os polissacarídeos microbianos são submetidos a métodos de caracterização física, química e biológica. Dentre os métodos de caracterização químicos mais utilizados, destaca-se a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

A espectrometria é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Ao incidir um feixe de radiação sobre a matéria os seus átomos do estado fundamental sofrem excitação passando para um nível mais energético. Ao retornar a estado inicial perdem a energia reemitindo radiação eletromagnética ou por degradação térmica, de modo que é possível a obtenção de um levantamento de dados físico-químicos que nos permite identificar substâncias com base nos diferentes padrões de absorção, reflexão e emissão da energia radiante (HARRIS, 2010).

Quase todos os compostos que tenham ligações covalentes absorvem na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Na química, a faixa de número de onda de interesse ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ) corresponde à região vibracional do infravermelho. A radiação nessa região pode causar excitações vibracionais moleculares, mas não apresenta energia suficiente para gerar transições eletrônicas. O FTIR coleta dados de alta resolução em uma ampla faixa espectral, sendo necessário o uso de um artifício matemático (transformada de

Fourier) para a conversão dos dados brutos no espectro no domínio da frequência. Apresenta uma maior sensibilidade e velocidade com relação a instrumentos dispersivos e é possível a obtenção de um espectro com uma razão melhor de sinal/ruído (PAVIA et al., 2010).

Essa técnica é um dos principais recursos utilizados para caracterização detalhada das estruturas químicas dos exopolissacarídeos. O uso desse método tem como vantagens a redução do tempo de análise e a capacidade de caracterização com uma quantidade substancial da amostra sem destruí-la (LOPES; FASCIO, 2004).

As características estruturais de um exopolissacarídeo produzido pelo *Lactobacillus plantarum* 70810 foram investigadas por cromatografia gasosa (GC), metilação, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN). Além disso, foi feita análises antitumorais do material obtido (WANG et al, 2013).

Vidhyalakshmi et al. (2016) utilizaram espectrofotometria (FT-IR), RMN <sup>13</sup>C e outras análises para caracterizar a composição química do exopolissacarídeo obtido de uma bactéria da espécie *Bacillus circulans* isolada da camada viscosa do coco. Além disso, tais autores avaliaram a atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-tumoral do exopolissacarídeo (EPS).

### **3.4.2 Análise térmica – TGA**

Além das propriedades químicas, a degradação térmica de polímeros vem sendo estudada por vários cientistas, pois a aplicabilidade de polissacarídeos depende de sua estabilidade térmica. A análise térmica permite avaliar as propriedades físicas de um material e/ou seus parâmetros em função da temperatura e/ou tempo, enquanto o material é submetido a um programa de temperatura e atmosfera controlada (LUCAS; G.SOARES; E.C.MONTEIRO, 2001).

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica analítica simples executada utilizando-se uma termobalança sensível, reprodutível e com resposta rápida as variações de massa. Essa técnica mede a perda de peso do material em função da temperatura nos fornecendo informações acerca da composição e estabilidade térmica da amostra (LUCAS; G.SOARES; E.C.MONTEIRO, 2001).

Estudos realizados por Wang et al. (2010) com a cepa *Lactobacillus plantarum* KF5 produtora de exopolissacarídeo mostraram detalhes das características químicas do composto por espectroscopia FT-IR e GC e das características físicas, como a temperatura de degradação de 279,59°C, determinada a partir da curva de TGA.

O exopolissacarídeo produzido pela cepa *Lactobacillus plantarum* RJF4 foi caracterizado como um composto de glicose e manose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e FTIR. A análise térmica revelou que o polissacarídeo é tolerante a temperaturas de até 225°C podendo, portanto, ser explorado para aplicações industriais (DILNA et al., 2015).

### **3.4.3 Análise da atividade biológica**

Recentemente, aumentaram-se as evidências de propriedades antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas em polissacarídeos produzidos por microrganismos. Esses exopolissacarídeos que possuem propriedades biológicas são fontes valiosas de polímeros naturais com diversas aplicações biotecnológicas (MOHAMED et al., 2018).

Vários estudos mostraram que o estresse oxidativo imposto por espécies reativas de oxigênio (ERO) são a causa direta ou indireta de várias condições e doenças humanas, como o envelhecimento, câncer, Alzheimer e epilepsia. A adição de antioxidantes exógenos em alimentos é uma prática comum que tem como objetivo preservar o alimento além de trazer diversos benefícios à saúde (PAN; MEI, 2010). Estudos voltados aos antioxidantes naturais têm ganhado destaque devido evidências de sua baixa citotoxicidade (KRIZKOVA et al., 2006).

Estudos realizados por Zhang et al. (2013) avaliaram atividade antioxidante de um exopolissacarídeo produzido pela cepa *Lactobacillus plantarum* C88 através de sua habilidade de eliminação *in vitro* dos radicais hidroxil e 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH). Resultados indicaram uma boa capacidade de eliminação de radical hidroxila. Também foi avaliado o efeito protetor na lesão oxidativa de células e os resultados demonstraram que o EPS tem efeitos antioxidantes que podem envolver a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO), regulação positiva das atividades antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas e redução da peroxidação lipídica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos desta pesquisa foram realizados no Laboratório de Tecnologia da Biomassa, pertencente a Embrapa Agroindústria Tropical.

### 4.1 Produção de exopolissacarídeos

#### 4.1.1 *Micro-organismos*

Os experimentos foram realizados com uma cepa de *Bacillus pumilus* (RAB9), uma cepa de *Bacillus cereus* (CMIAT 186) e duas cepas de *Bacillus stratosphericus* (RMIAT 109 e CMIAT 61). A cepa *Bacillus pumilus* (RAB9) avaliada foi proveniente da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife-PE; as demais cepas avaliadas foram provenientes da Coleção de Culturas da Embrapa Agroindústria Tropicais (CNPAT).

#### 4.1.2 *Formulações dos meios*

##### a) *Meio de manutenção*

Para a manutenção e ativação das linhagens foi utilizado o meio NYDA de composição apresentada na Tabela 2. Foram adicionados cerca de 10 mL do meio a tubos rosqueáveis e autoclavados a 121°C por 30 minutos.

**Tabela 2** – Composição do meio de manutenção e ativação das linhagens de *Bacillus sp.*

Componente	Composição (gL <sup>-1</sup> )	Marca
Dextrose P.A	10,0	VETEC
Extrato de levedura	5,0	KASVI
Extrato de carne	3,0	HIMEDIA
Peptona de carne	5,0	SIGMA-ALDRICH
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> P.A	3,0	VETEC

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O P.A	0,5	CRQ – LTDA
ÁGAR	15,0	DINÂMICA

Fonte: CAVALCANTI et al., (2005)

### **b) Meio de produção**

Para os experimentos de fermentação foi utilizado o meio proposto por Rodriguez & Callieri (1986) de composição apresentada na Tabela 3. Preparados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL do meio autoclavados a 121°C por 30 minutos. Para a pré-fermentação foi utilizado uma concentração de 10 gL<sup>-1</sup> de sacarose.

**Tabela 3** – Composição do meio de produção das linhagens de *Bacillus sp.*

Componente	Composição (gL <sup>-1</sup> )	Marca
Extrato de levedura	5,0	KASVI
Sacarose P.A	50,0	DINÂMICA
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> P.A	1,0	VETEC
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O P.A	1,0	CRQ – LTDA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> P.A	1,0	BIOTEC

Fonte: Rodriguez & Callieri (1986)

### **4.1.3 Manutenção e ativação**

As linhagens de *Bacillus sp* estavam preservadas em caldo NYD com glicerol 15% em tubos acondicionados em ultra freezer a -80°C (SOUSA, 2013). Desta cultura estoque foram

feitos repiques para ativação da linhagem em caldo NYD em tubos e posterior reativação em meio NYDA inclinado a 30°C por 24 horas para utilização nos testes subsequentes.

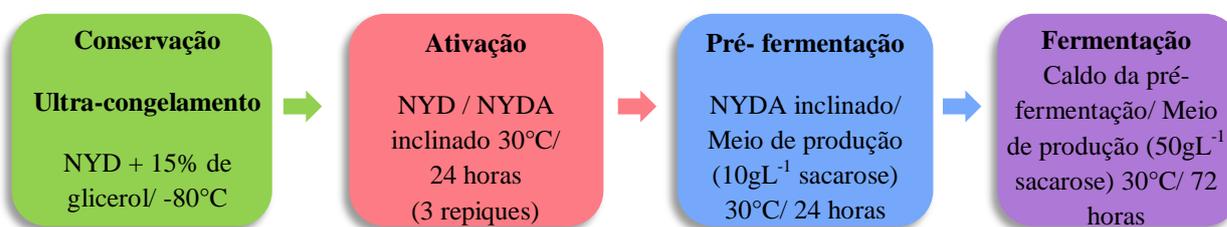
#### 4.1.4 Preparo do Inóculo

A partir do ágar NYDA inclinado, incubado em BOD a 30°C por 24 horas, foi feito a transferência do inóculo, com auxílio de uma alça, para um erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio definido por Rodriguez & Callieri (1986). O procedimento foi feito em triplicata para cada micro-organismo e foi realizada a incubação a 30°C, 200 rpm por 24 horas em agitador rotatório.

#### 4.1.5 Fermentação

Inoculou-se os Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio por Rodriguez & Callieri (1986) com 2 mL do caldo obtido da pré-fermentação. A padronização do volume de inóculo adicionado em cada frasco foi feita segundo Ernandes (2006). A fermentação foi conduzida em agitador rotatório a 30°C, 200 rpm por 72 horas. Após a interrupção da fermentação, os cultivos foram centrifugados a 3600 rpm durante 15 minutos e as amostras de sobrenadante obtidas foram coletadas e utilizadas para a produção dos exopolissacarídeos. A Figura 3 apresenta o fluxograma de sequência de etapas da manutenção à fermentação.

**Figura 3:** Fluxograma das etapas de manutenção à fermentação.



Fonte: elaborada pelo autor.

No presente trabalho, foram realizadas duas fermentações com volumes diferentes de meio de cultura. Inicialmente, foi realizada a fermentação com 50 mL de meio apresentada acima e, posteriormente foi realizada o mesmo procedimento em duplicata com 100 mL de meio para posterior análise acerca da quantidade de exopolissacarídeo obtida em diferentes condições de produção.

### **4.3 Extração e purificação do EPS**

A extração e purificação do exopolissacarídeo foram conduzidas segundo Castellane e Lemos (2007). Para isso foi feita a precipitação do sobrenadante com etanol anidro gelado (proporção 3:1) por 24 horas, a 4°C. Posteriormente, o conteúdo foi seco em estufa a vácuo, a 45°C, por aproximadamente 72 horas. O precipitado obtido, fortemente aderido no recipiente, foi raspado e ressuspenso em 30 mL de etanol anidro gelado. A mistura foi centrifugada a 3600 rpm por 20 minutos. Esse procedimento de purificação foi conduzido 3 vezes de forma a minimizar a presença de meio de fermentação, maximizando a purificação do EPS. As amostras foram transferidas para cadinhos previamente pesados e conduzidas para secagem em estufa a vácuo, a 45°C por 24 horas. Após secagem, as amostras foram resfriadas no dessecador e novamente pesadas de forma a obter o peso de exopolissacarídeo na condição de fermentação utilizada. Os exopolissacarídeos foram então macerados, congelados e liofilizados para obtenção de um pó, o qual foi conduzido às análises de caracterização.

### **4.4 Caracterizações dos EPS**

#### ***4.4.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho – FTIR***

O exopolissacarídeo seco (2,0 mg) foi misturado ao pó de KBr (98 mg), moído e prensado em pastilhas de 7,0 mm para medições na faixa de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  usando o espectrofotômetro com transformação de Fourier da PerkinElmer (VIDHYALAKSHMI et al., 2016).

#### ***4.4.2 Análise termogravimétrica (TGA)***

A análise termogravimétrica do exopolissacarídeo foi realizada usando o aparelho STA 6000 da PerkinElmer com 10 mg do material de teste. As amostras de EPS foram aquecidas a uma taxa de aquecimento linear de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  em uma faixa de temperatura de 50 a 600  $^{\circ}\text{C}$ . Os experimentos foram realizados em atmosfera de Nitrogênio a um fluxo de 40  $\text{mL min}^{-1}$  (WANG et al., 2015).

#### ***4.4.3 Capacidade antioxidante por DPPH***

A capacidade de captura de radicais livres, usando 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), foi determinada de acordo com o método descrito por Yang, Zheng e Cao (2009). Foi adicionado 5 mL de solução de DPPH em etanol ( $120\mu\text{g L}^{-1}$ ) à um tubo de ensaio

contendo 1mL de EPS purificado variando-se suas concentrações em 50,150 e 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A mistura foi agitada e incubada no escuro por 30 minutos e foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro Varian Cary 50 a 517 nm. A capacidade é calculada com base na equação 1.

$$\textit{Capacidade antioxidante} (\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{amostra}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde  $A_{DPPH}$  é a absorbância da reação que contém todos os reagentes, exceto que água destilada foi usada no lugar da amostra; e  $A_{amostra}$  é a absorbância na presença da amostra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração e purificação do biopolímero

A extração de exopolissacarídeo pelas cepas de *Bacillus sp* foi realizada a partir da precipitação do sobrenadante, obtidos pós fermentação, com etanol anidro gelado na proporção de 3:1 de acordo com metodologia descrita no item 4.3. Em ambas as fermentações realizadas foram evidenciadas a presença do precipitado branco, indicativo visual da obtenção do EPS, no fundo do recipiente contendo sobrenadante e o agente precipitante para todos os microrganismos estudados. Após a secagem total do material em estufa a 45°C foi observado à mudança de coloração do precipitado de branco para amarelo indicando interferência do meio de cultura no biopolímero obtido. O conteúdo completamente seco e fortemente aderido no recipiente foi raspado e conduzido à etapa de purificação. Para a maximização da purificação do exopolissacarídeo obtido foram realizadas sucessivas lavagens com etanol anidro gelado. Em estudos anteriormente realizados por Wang et. al (2010) foi feita uma etapa de ressuspensão do exopolissacarídeo em água destilada entre as precipitações realizadas com etanol anidro. Essa etapa de ressuspensão do material em água garantiu a obtenção de um biopolímero com menor interferência do meio de cultura nesses estudos. A não realização dessa etapa nos experimentos conduzidos durante as duas fermentações realizadas nesse trabalho provavelmente levou a obtenção de exopolissacarídeos com menor nível de pureza. Após a purificação, os exopolissacarídeos foram secos e devidamente pesados para obtenção da quantidade de biopolímero produzido em ambas as condições de fermentação, elucidadas na Tabela 4.

**Tabela 4** – Massa de exopolissacarídeo obtidas em diferentes volumes de meio para Erlenmeyer de 250 mL.

Micro-organismo	Fermentação 1 (50mL)		Fermentação 2 (100mL)	
	Massa de EPS obtida (g)	Concentração (mg/mL)	Massa de EPS obtida (g)	Concentração (mg/mL)
<b>RAB9</b>	1,92 ± 0,19	<b>12,8</b>	0,59 ± 0,20	<b>2,95</b>
<b>CMIAT 61</b>	1,42 ± 0,55	<b>9,47</b>	1,86 ± 0,03	<b>9,3</b>
<b>RMIAT 109</b>	1,46 ± 0,02	<b>9,73</b>	1,48 ± 0,61	<b>7,4</b>
<b>CMIAT 186</b>	N.D.	<b>N.D.</b>	0,73 ± 0,08	<b>3,65</b>

\*Massa referente à duplicata.

Na fermentação 1 não houve crescimento da bactéria CMIAT 186 durante o processo de pré-fermentação e ocorreu a perda da triplicata da cepa CMIAT 61 durante experimentos conduzidos com a mesma. Maior produção de EPS foi obtida por *Bacillus pumilus* (RAB9), com concentração de 12,8 mg/mL.

A comparação das concentrações obtidas em ambas as fermentações para todos os exopolissacarídeos produzidos foi superior na fermentação 1. De modo que, a condução de uma fermentação com menos meio de cultura, neste caso 50 mL, mostrou-se a mais adequada no ponto de vista de produção. Estudos futuros devem ser realizados para melhorar a produção. A otimização do meio é uma etapa vital para aumentar a concentração do EPS. Também, o estudo de produção de EPS variando-se o tempo de cultivo é outra ação válida pra buscar melhorar a produtividade de biopolímero produzido.

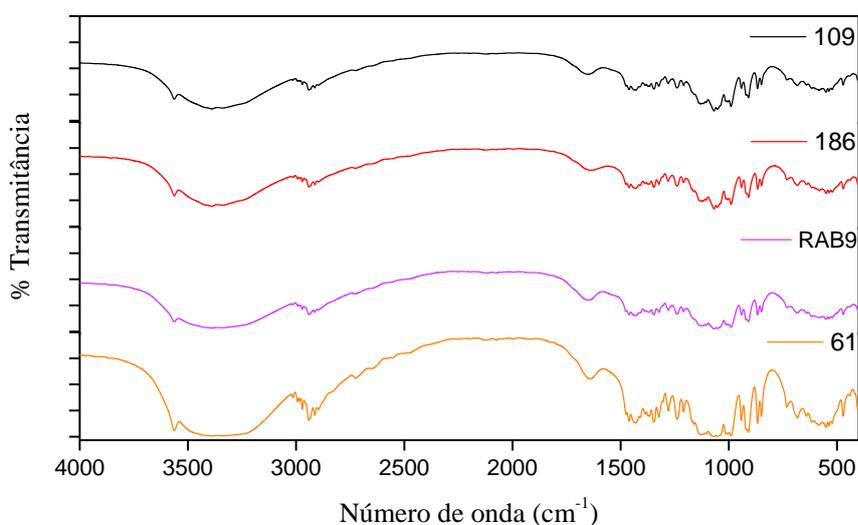
Nos estudos realizados por Zheng et.al (2016) com uma cepa de *Bacillus cereus*, foi exibido uma produção máxima de exopolissacarídeo de 46 mg/mL com 10 horas de cultivo. Foram realizados estudos de atividade antioxidante do EPS e os resultados indicaram que o mesmo poderia ser útil na prevenção de danos oxidativos no DNA e oxidação celular nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

Rani et.al (2017) produziram, purificaram e caracterizaram um heteropolissacarídeo secretado por *Bacillus tequilensis* FR9 (BtqEPS). Através de uma etapa de otimização foi obtido uma produção máxima de 6,83 mg/mL em meio suplementado com sacarose a 2%. Trabelsi et al. (2015) relataram que a utilização da fonte de carbono para a produção de EPS difere de espécie para espécie. No entanto, a sacarose vem sendo favoravelmente usada por muitas espécies de *Bacillus* e *Lactobacillus*.

## 5.2 Caracterizações do biopolímero

### 5.2.1 Elucidação dos grupos funcionais presentes no composto

Os ensaios espectroscópicos na região do infravermelho permitiram a identificação dos grupos funcionais característicos dos biopolímeros obtidos. A comparação e análise dos picos mostrou semelhanças entre os EPS produzidos pelas diferentes espécies de *Bacillus sp* estudadas no presente trabalho (Figura 4).



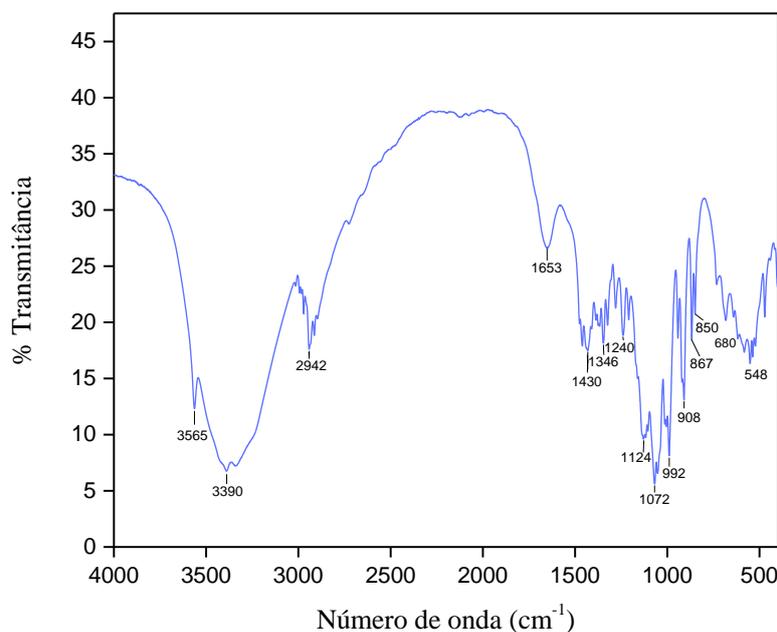
**Figura 4** – Análise espectroscópica na região do infravermelho (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) utilizando-se pastilha de KBr contendo o biopolímero produzido pelas linhagens de *Bacillus sp*.

O espectro de absorção no infravermelho de um composto é muitas vezes chamado de impressão digital da molécula sendo, geralmente, a primeira ferramenta utilizada para a caracterização de estruturas químicas de biopolímeros (KACURÁKOVÁ; WILSON, 2001).

Polissacarídeos contêm um número significativo de grupos hidroxilas que apresentam uma ampla banda de absorção arredondada acima do comprimento de onda  $3000 \text{ cm}^{-1}$ . A banda de absorção em  $3390 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 5), referente ao estiramento axial O-H, tem essa característica típica (HOWE; ISHIDA; CLARK, 2002). O pico em  $3365 \text{ cm}^{-1}$  e o formato da banda em  $3390 \text{ cm}^{-1}$ , com a presença de dois picos finos, indica a sobreposição dos alongamentos

de

O-H e N-H, onde a última pode ser referente à possível presença de resíduo proteico (OSIRO; FRANCO; COLNAGO, 2011).



**Figura 5** – Análise espectroscópica na região do infravermelho (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) utilizando-se pastilha de KBr contendo o biopolímero produzido pela cepa de *Bacillus stratosphericus* (RMIAT 109).

Na comparação com os espectros IR de exopolissacarídeos documentados na literatura, as bandas de absorção em  $2942 \text{ cm}^{-1}$  e  $1653 \text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas, respectivamente, a vibração do alongamento C-H e a possível presença de grupos C=C na estrutura do carboidrato (SAMPAIO, 2014).

Vibrações de dobramento C-H para grupos metila e metileno ocorrem entre  $1465$  e  $1370 \text{ cm}^{-1}$  e, as referentes ao =C-H no plano ocorrem entre  $1300$  e  $1000 \text{ cm}^{-1}$ . A análise dos espectros revelou um conjunto complexo de bandas nessas regiões. Além disso, observaram-se dois picos de absorção, em  $992 \text{ cm}^{-1}$  e  $912 \text{ cm}^{-1}$ , padrões para alcenos de alquila substituídos (PAVIA, 2010).

As bandas em  $908\text{ cm}^{-1}$ ,  $867\text{ cm}^{-1}$  e  $850\text{ cm}^{-1}$  são características da região anomérica de açúcares. Nessa região ( $950\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ) ocorre à distinção entre as configurações  $\alpha$  e  $\beta$  da molécula. Em estudos realizados por Notararigo et al. (2013) foram observados no FTIR um ombro de absorção em  $849\text{ cm}^{-1}$  e um pico mais intenso em  $916\text{ cm}^{-1}$ , ambas características dos anômeros, para o exopolissacarídeo produzido pelo *L. Mesenteroides* O RTF10 em meio suplementado com sacarose (0,8) como fonte de carboidratos.

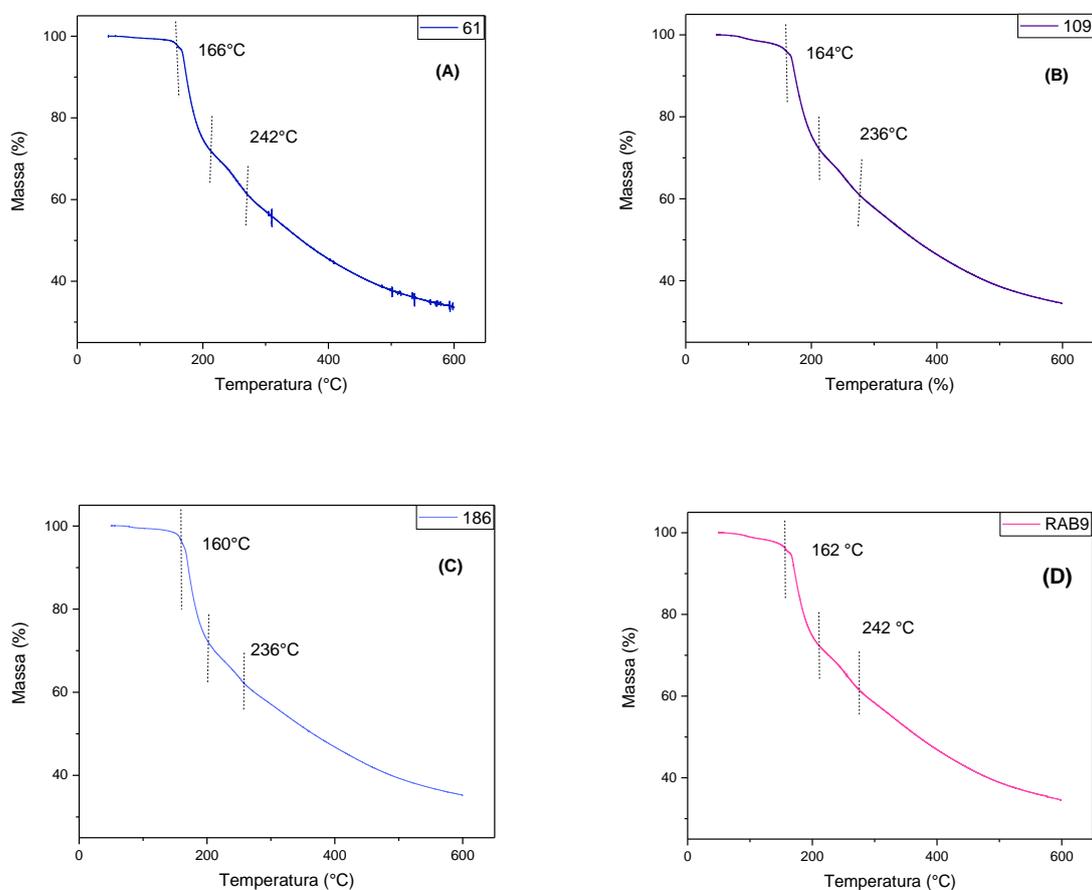
A região entre  $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  é dominada por vibrações do anel justapostas com vibrações de estiramento de grupos laterais (C-OH) e por vibrações de ligações glicosídicas C-O-C. Essa região (abaixo de  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) é considerada a região de impressão digital dos polissacarídeos, onde a posição e a intensidade das bandas são específicas de cada composto, permitindo sua possível identificação. De acordo com análise dos estudos realizados por Kacuráková (2000) o pico máximo em número de onda de  $1072\text{ cm}^{-1}$  é atribuído à unidade de galactose.

Zheng et al. (2016) analisaram o espectro de infravermelho de um exopolissacarídeo produzido por uma cepa SZ-1 de *Bacillus cereus*, os espectros revelaram características funcionais, tais como um grupo OH com banda larga em  $3417\text{ cm}^{-1}$  e um fraco alongamento C-H de grupo metila em  $2925\text{ cm}^{-1}$ . A banda de absorção em  $1136\text{ cm}^{-1}$  confirmou que o EPS é um polissacarídeo ácido e a banda em  $1646\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída à água ligada à molécula de fosfolipídio.

### **5.2.2 Análise termogravimétrica do biopolímero produzido**

As curvas termogravimétricas podem ser indicativas de características térmicas favoráveis ao polímero. O seu comportamento térmico desempenha um papel fundamental para determinar sua possível aplicação industrial. De modo que os resultados nos indicam, por exemplo, se o biopolímero apresenta uma boa vida de prateleira ou se pode ter sua utilização associada à fabricação de excipientes para composição de medicamentos ou como base para cosméticos (SAMPAIO, 2014; WANG et al 2015).

Na figura 6 ilustram-se as características das curvas de TGA do processo de decomposição térmica dos polímeros produzidos pelas cepas de *Bacillus sp* ocorridas em três etapas. Observam-se características térmicas semelhantes entre os exopolissacarídeos estudados.



**Figura 6** – Análise termogravimétrica (TGA) dos biopolímeros. **(A)** CMIAT 61, **(B)** RMIAT 109, **(C)** CMIAT 186, **(D)** RAB9.

Nas curvas termogravimétricas, processo caracterizado como dinâmico, a perda de massa é registrada continuamente à medida que a temperatura aumenta a uma razão constante. Uma perda de peso inicial, em torno de 4%, registrada na região entre 55° e 95°C refere-se ao teor de umidade e álcool presente no EPS, que contribuiu para o amplo trecho hidroxil na análise FTIR. Além disso, aproximadamente 96% de massa dos exopolissacarídeos foram estáveis até 160 °C, sugerindo que esses compostos não devem ser submetidos a faixas de temperatura próximas a esse valor para não comprometer sua integridade física. Os biopolímeros apresentaram uma perda de massa considerável, em torno de 25%, na região

entre 160°C e 215°C, referente à despolimerização do polissacarídeo, com temperaturas de degradação variando de 160°C a 164°C para os EPS analisados. Na terceira etapa, os processos de decomposição diminuíram gradualmente e a perda total de peso foi de 10%, região entre 215°C e 275°C. Posteriormente, ambos os eventos ocorrem em conjunto levando a degradação do material a uma taxa lenta. Nenhuma das amostras foram completamente degradadas ao final da análise na temperatura de 600°C, ficando todas com cerca de 34% de massa.

Rani et al. (2017) produziram, purificaram e caracterizaram um heteropolissacarídeo produzido por *Bacillus tequilensis* FR9 (BtqEPS) e detectaram a partir da análise termogravimétrica (TGA), realizada de forma dinâmica, que o polímero apresentou uma perda de massa inicial entre 30 e 100 °C devido a perda de umidade que é gerada pelo aumento dos grupos carboxilas em polissacarídeos. Na segunda fase, foi observada uma perda considerável de massa (58%) em torno de 300°C com diminuição, posterior, a uma taxa lenta relatando a existência da porção estável de açúcar. A temperatura de degradação do polímero foi em torno de 239,72 °C. De modo que, o exopolissacarídeo é considerado termoestável e pode ser potencialmente utilizado nas indústrias de alimentos e laticínios.

Apesar de não apresentar uma temperatura de degradação tão elevada, comparando-se com outros exopolissacarídeos já estudados, basicamente, sua exploração comercial pode ser conduzida a processos que se utilizem de temperaturas inferiores a 160 °C, como por exemplo, em indústrias de laticínios onde na maioria dos processos, a temperatura raramente aumenta além de 150 °C (KALPANA et al., 2018) (EZHIL; BELUR; M.B, 2015).

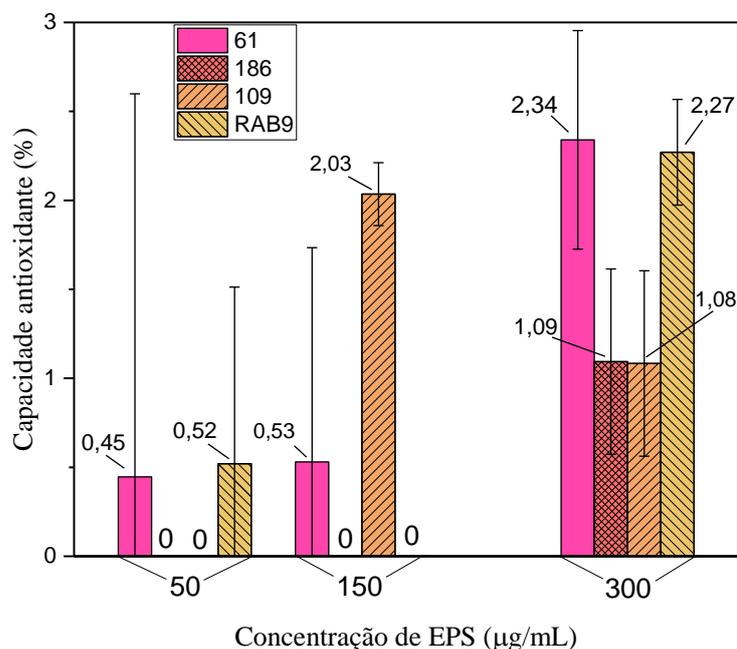
### **5.2.3 Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)**

O teste DPPH é um dos métodos mais utilizados para a triagem dos compostos antioxidantes, sendo uma ferramenta amplamente aceita para estimar a capacidade de captura de radicais livres pelos mesmos. Quando os radicais livres de DPPH são capturados, a cor da mistura de reação muda de púrpura para amarela (passando por um tom rosa em concentrações intermediárias de antioxidantes) e a absorbância em 517 nm diminui. Essa atividade pode ser devida à presença do grupo hidroxila e outros grupos funcionais do exopolissacarídeo que podem doar elétrons para reduzir os radicais a uma forma mais estável ou reagir com os radicais livres para terminar a reação em cadeia radical. De modo que, há uma correlação entre as propriedades antioxidantes do biopolímero com a conformação,

estrutura e massa molecular de seus componentes monossacarídeos (DILNA et al., 2015) (MOHAMED et al., 2018).

A análise das propriedades antioxidantes do EPS produzido pela cepa de *Bacillus stratosphericus* (CMIAT 61) ilustrado da Figura 7 exibiu um aumento da capacidade antioxidante com o aumento da concentração de EPS. O valor de 2,34%, na concentração de 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , foi o maior valor obtido comparando-se com todas as cepas de *Bacillus sp* estudadas no presente trabalho. Para a cepa de *Bacillus cereus* (CMIAT 186) não foi observado capacidade antioxidante nas concentrações de 50 e 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , porém, com o aumento da concentração para 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi obtido um valor de 1,09%. O biopolímero produzido pela cepa de *Bacillus stratosphericus* (RMIAT 109) não exibiu capacidade antioxidante na concentração 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , porém, na concentração de 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi observado um valor de 2,03 %, com baixo desvio padrão, já para a concentração de 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi observado uma diminuição desse valor para 1,09 %, porém, com um maior desvio padrão. De modo que, seria necessária a realização de novos estudos em maiores concentrações para se entender melhor o comportamento do EPS obtido por esse microrganismo. Avaliando-se o EPS da cepa de *Bacillus pumilus* (RAB9) foi observado um valor de 0,52% de capacidade antioxidante em 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com um alto valor de desvio padrão e, não foi observado capacidade antioxidante a 150  $\mu\text{g / mL}$ . Porém, aumentando-se a concentração de EPS para 300  $\mu\text{g / mL}$  foi obtido um maior valor de capacidade antioxidante (2,27 %).

Avaliando-se os maiores valores de capacidade antioxidante obtidos no presente estudo (Figura 7) observa-se que o exopolissacarídeo produzido pela cepa de *Bacillus pumilus* (RMIAT 109) exibiu, em uma menor concentração (150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), um valor próximo aos obtidos pelas cepas CMIAT 61 e RAB9 em uma concentração mais elevada (300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), podendo indicar a produção de um EPS mais ativo por esse microrganismo. Porém são necessários estudos futuros com essas cepas de bactérias, utilizando-se maiores concentrações e melhores métodos de purificação do EPS, de modo que os levantamentos de dados nos permitam avaliar qual cepa se apresenta de forma mais promissora as propriedades de antioxidantes.



**Figura 7** – Capacidade antioxidante dos exopolissacarídeos produzidos pelas linhagens de *Bacillus sp.*

Analisando-se os resultados obtidos por esse método de avaliação de atividade antioxidante de biopolímeros foi constatado significativos valores de desvios padrões, tendo nas concentrações de 50 e 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  variações extremas, com exceção do obtido para o *Bacillus pumilus* (RMIAT 109). Esse fato diminui a confiabilidade dos dados apresentados e ocorrem por conta da alta sensibilidade do método empregado, onde erros de  $\pm 1$  a 2% no valor da análise são habituais. Assim, as atividades apresentadas estão na faixa de erro possível do método. De modo que, erros na pipetagem e na pesagem do material para a preparação das amostras, visto o baixo valor de concentração utilizado nas análises, influenciam de forma drástica nos valores obtidos.

Os resultados obtidos para a capacidade antioxidante (eliminação dos radicais DPPH) para os exopolissacarídeos estudados foram menores comparando-se com os estudos realizados por Mohamed et al. 2018 com a cepa *Bacillus altitudinis* MSH2014 nas mesmas condições de análise. Nesse estudo, foi relatada uma dependência da capacidade antioxidante com a concentração do EPS, onde para o menor valor de concentração (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) do EPS

foi alcançado um valor em torno de 30 % de capacidade antioxidante e foi obtido um valor de EC 50 de 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nesses estudos foram realizadas diversas etapas para purificação do EPS, dentre elas foi realizado etapas de diálise contra água deionizada e aplicações em colunas cromatográficas (DEAE-celulose e Sephadex G-200) usando soluções de NaCl para eluição.

As propriedades antioxidantes e antibacterianas de um exopolissacarídeo obtido a partir de uma cepa de *Lactobacillus sp* foram estudadas por Trabelsi et al. (2017). Os resultados mostraram que o EPS obtido apresentava atividade antioxidante potencial determinada através de quatro ensaios diferentes: atividade de captura de DPPH, poder redutor, branqueamento de caroteno pelo ensaio de ácido linoleico e atividades de quelação de metais. Para o ensaio de DPPH foi obtido um valor de capacidade antioxidante de 14 % para a concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e com o aumento da concentração de EPS para 10  $\text{mg mL}^{-1}$  foi alcançado o valor de 95,76%.

Os resultados e as condições de análise dos estudos realizados por Mohamed et al. 2018 e Trabelsi et al. (2017) nos mostram a possibilidade da realização de estudos com essas cepas de *Bacillus sp* para determinação da atividade antioxidante em maiores concentrações de EPS, de modo que se pode avaliar a possibilidade de aumento dessa capacidade antioxidante além de se trabalhar com outros métodos de análise para confirmação. Além disso, trabalhar com métodos de purificação mais complexos e estudados pode garantir a obtenção de um EPS mais puro, tendo a retirada de interferentes como um parâmetro para se analisar a possibilidade de uma melhor resposta nesses estudos.

## 6 CONCLUSÕES

Confirmou-se a produção de biopolímero pelas cepas: *Bacillus pumilus* (RAB9), *Bacillus cereus* (CMIAT 186) e *Bacillus stratosphericus* (RMIAT 109 e CMIAT 61) estudadas no presente trabalho. A produção máxima de exopolissacarídeo foi obtida na fermentação contendo 50 mL de meio de cultura à base de sacarose conduzida por 72 horas a 37°C pelo microrganismo *Bacillus pumilus* (RAB9), onde a concentração obtida foi de 12,8 mg mL<sup>-1</sup>, sendo a condução dessa fermentação mais adequada. A concentração alcançada foi superior a obtidos em outros estudos, porém, ainda é necessário estudos para se definir condições otimizadas.

Os biopolímeros produzidos pela diferentes linhagens estudadas tiveram sua metodologia de purificação definida e sua natureza química confirmada. Porém, os mesmos não foram obtidos com 100% de pureza, devido à interferência do meio de cultura constatada pela mudança de coloração do precipitado obtido. Outras metodologias abordadas em diferentes estudos apontam pra utilização de etapas durante a extração e purificação que podem auxiliar na obtenção de melhores resultados de pureza.

A caracterização química assegurou que o mesmo é um polissacarídeo, identificando-se nele grupos funcionais como: O-H, C-H, C=C característicos de carboidratos, além da presença de picos nas regiões consideradas de impressão digital de biopolímeros, avaliados a partir da espectroscopia na região do infravermelho. A comparação e análise dos picos mostrou semelhanças entre os EPS produzidos pelas diferentes espécies de *Bacillus sp* estudadas no presente trabalho. Os exopolissacarídeos produzidos e purificados possuem uma temperatura de degradação em torno de 160°C, estabelecida por TGA. Podendo ser utilizado em indústrias cujos processos não ultrapassem a mesma.

A atividade antioxidante dos biopolímeros foi avaliada através do método de DPPH, onde foi obtido um valor máximo de capacidade antioxidante de 2,34% pelo microrganismo *Bacillus stratosphericus* (CMIAT 61) na concentração de 300 µg mL<sup>-1</sup>. Apesar dos baixos valores obtidos e da limitação do método propostas de novos estudos utilizando-se maiores concentrações e outras metodologias de purificação pode conduzir a melhores resultados e confirmação do real potencial biotecnológico desses biopolímeros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 386. **Diário Oficial da União**. Brasília, 05 ago. 1999. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386_99.htm). Acesso em: 27 set. 2019
- AQUINO, Denise Silva de. **Produção de dextrana por novas linhagens de bactérias isoladas da cana-de-açúcar**. 2006. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- BORGES, Caroline Dellinghausen et al. CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS PRODUZIDOS POR *Beijerinckia sp.* 7070 EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p.327-332, set. 2004.
- BRAGADEESWARAN, S. et al. Exopolysaccharide production by *Bacillus cereus* GU812900, a fouling marine bacterium. **African Journal Of Microbiology Research**, Parangipettai, v. 5, p.4124-4132, out. 2011.
- BUENO, Silvia Messias; GARCIA-CRUZ, Crispin Humberto. Optimization of polysaccharides production by bacteria isolated from soil. **Brazilian Journal Of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 3, p.296-301, set. 2006.
- CALAZANS, Gmt et al. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.19-21, 1997.
- CASTELLANE, Tereza Cristina Luque; LEMOS, Eliana Gertrudes de Macedo. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p.1503-1506, out. 2007.
- CAVALCANTI, Márcia Tanajura et al. Crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes temperaturas, pH, concentrações de cloreto de sódio e fontes de carbono. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p.1313-1318, dez. 2005.
- CERNING, J.. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. **Le Lait**, [s.l.], v. 75, n. 4-5, p.463-472, 1995.
- CUNHA, Pablyana Leila R. da; FEITOSA, Regina Célia M. de Paula e Judith P. A.. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, Fortaleza, v. 32, n. 3, p.649-660, mar. 2009.
- DILNA, Sasidharan Vasanthakumari et al. Characterization of an exopolysaccharide with potential health- benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. **Lwt - Food Science And Technology**, Kawagoe, p.1179-1186, 2015.
- DRUZIAN, Janice Izabel. **ESTUDO DA ESTRUTURA DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR DUAS ESPÉCIES DE RHIZOBIUM E UMA DE BRADYRHIZOBIUM ISOLADAS DE SOLO DE CULTIVAR DE FEIJÃO DE CORDA (*Vigna unguiculata* L.)**. 2000. 198 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química Industrial, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- ERNANDES, Fernanda Maria Pagane Guerreschi. **Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo**

**de cana-de-açúcar**). 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 237-243, 1997.

EZHIL, Inemai; BELUR, Prasanna D.; M.B, Saidutta. Production Optimization of a New Exopolysaccharide from *Bacillus Methylophilicus* and Its Characterization. **International Journal Of Biotechnology And Biochemistry**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.21-39, 2015.

FREITAS, Filomena; ALVES, Vítor D.; REIS, Maria A. M.. Bacterial Polysaccharides: Production and Applications in Cosmetic Industry. **Polysaccharides**, [s.l.], p.2017-2043,2015.

GARCIA-OCHOA, F et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.549-579, nov. 2000.

HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. Production and characterization of microbial levan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 2, p. 393-396, 1990.

HARRIS, Daniel C.. **QUANTITATIVE CHEMICAL ANALYSIS**. 8. ed. New York: W. H. Freeman And Company, 2010.

HOWE, Kerry J.; ISHIDA, Kenneth P.; CLARK, Mark M.. Use of ATR/FTIR spectrometry to study fouling of microfiltration membranes by natural waters. **Desalination**, [s.l.], v. 147, n. 1-3, p.251-255, set. 2002.

ISOBE, Y.; ENDO, K.; KAWAY, H. Properties of a highly viscous polysaccharide produced by a *Bacillus* strain isolated from soil. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tóquio, v. 56, p. 636-639, 1992.

KACURÁKOVÁ, M.; WILSON, R.H. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.291-303, abr. 2001.

KACURÁKOVÁ, M. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 43, n. 2, p.195-203, out. 2000.

KALPANA, Ramaraju et al. Exopolysaccharide from *Bacillus cereus* VK1: Enhancement, characterization and its potential application in heavy metal removal. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 171, p.327-334, nov. 2018.

KAWAI, H. Production of a novel extracellular polysaccharide by a *Bacillus* strain isolated from soil. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tóquio, v. 56, p. 853-857, 1992.

KRIZKOVA, Livia et al. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: Mannan-human serum albumin and mannan-penicillin G acylase. **Mutation Research**, 606 (1-2) (2006), pp. 72-79

LIU, Long et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 10, n. 1, 2011.

LOPES, Wilson Araújo; FASCIO, Miguel. ESQUEMA PARA INTERPRETAÇÃO DE ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO. **Química Nova**, Salvador, v. 27, n. 4, p.670-673, maio 2004.

LUCAS, Elizabete F.; G.SOARES, Bluma; E.C.MONTEIRO, Elisabeth. **Caracterização de polímeros**: Determinação de peso molecular e Análise térmica. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

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

NERY, Tatiana Barreto Rocha et al. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 8, p.1937-1941, 2008.

NOTARARIGO, Sara et al. Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.57-64, mar. 2013.

OSIRO, Denise; FRANCO, Roberto W. Assis; COLNAGO, Luiz Alberto. Spectroscopic characterization of the exopolysaccharide of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in Cu<sup>2+</sup> resistance mechanism. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 22, n. 7, p.1339-1345, jul. 2011.

PAIVA, Donald L et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PAN, Daodong; MEI, Xiuming. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. lactis 12. **Carbohydr. Polym.**, 80 (3) (2010), pp. 908-914

PEREIRAA, Gilberto V. de Melo et al. Bioactive Polysaccharides Produced by Microorganisms: Production and Applications. In: SARAN, Saurabh; BABU, Vikash; CHAUBEY, Asha. **High Value Fermentation Products**. 2. ed. Curitiba: Scrivener Publishing Llc, 2019. Cap. 12. p. 231-252.

PORTILHO, Márcia. **Avaliação da produção de exopolissacarídeos insolúvel por duas linhagens de Agrobacterium sp.** 2002. 86 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

RABINOVITCH, Leon; OLIVEIRA, Edmar Justo de. **COLETÂNEA DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS E METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA O ESTUDO DE Bacillus E GÊNEROS ESPORULADOS AERÓBIOS CORRELATOS**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2015. 160 p.

RANI, Rizwana Parveen et al. Physicochemical and biological characterization of novel exopolysaccharide produced by *Bacillus tequilensis* FR9 isolated from chicken. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 96, p.1-10, mar. 2017.

RODRIGUEZ, E.; CALLIERI, D.A.S. High yield conversion of sucrose into ethanol by a flocculent *Zymomonas* sp. isolated from sugarcane juice. **Biotechnology Letters, Kew**, v.8, p.745-748, 1986.

ROSEIRO, Jc et al. Medium development for xanthan production. In: BOUDRANT, J.; ZHONG, Jj. **Process Biochemistry**. 3.ed. Elsevier Ltd, 1992. p. 167-175.

SAMPAIO, Mariana Gomes Vidal. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM POLISSACARÍDEO BACTERIANO COM VISTAS A SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SOMENSI, Francini Yumi Kagimura. **BIOPRODUÇÃO DE B-(1→6)-D-GLUCANA E OBTENÇÃO DE DERIVADO POR CARBOXIMETILAÇÃO VISANDO ATIVIDADE BIOLÓGICA**. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

SOUSA, Cívita Teixeira de. **PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE Bacillus sp. RAB9 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA**. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

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. Ca 6. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 103, p.194-201, out. 2017.

TRABELSI, Imen et al. Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 74, p.541-546, mar. 2015.

TIWARI, Shalini; PRASAD, Vivek; LATA, Charu. *Bacillus*: Plant Growth Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture and Environment. In: SINGH, Jay Shankar; SINGH, Dp. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Lucknow: Elsevier B.v., 2019. Cap. 3. p. 43-55.

Vidhyalakshmi et al. *Bacillus circulans* exopolysaccharide: Production, characterization and bioactivities. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Chennai, p.405-414, fev. 2016.

WANG, Ji et al. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 74, p.119-126, mar. 2015.

WANG, Kun et al. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Nanjing, p.133-139, out. 2013.

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

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

ZHENG, Li et al. Antioxidant and DNA Damage Protecting Activity of Exopolysaccharides from the Endophytic Bacterium *Bacillus cereus* SZ1. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.174-188, 4 fev. 2016.

YANG, Zhenfeng; ZHENG, Yonghua; CAO, Shifeng. Effect of High Oxygen Atmosphere Storage on Quality, Antioxidant Enzymes, and DPPH-Radical Scavenging Activity of Chinese Bayberry Fruit. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.176-181, 14 jan. 2009.