

# Capacidad antioxidante de bacterias lácticas aisladas de peces e invertebrados marinos de la provincia de Chubut, Patagonia-Argentina

## Antioxidant capacity of lactic acid bacteria isolated from marine fish and invertebrates of the province of Chubut, Patagonia, Argentina

Franco M. Sosa<sup>1,2</sup>, Romina B. Parada<sup>1,2</sup>, María A. Sánchez-Cabrera<sup>1</sup>,  
Emilio R. Marguet<sup>1</sup> y Marisol Vallejo<sup>1\*</sup>



### RESUMEN

La actividad antioxidante de las bacterias ácido lácticas (BAL) ha sido estudiada en profundidad en cepas aisladas de organismos terrestres, alimentos fermentados y sin procesar. Sin embargo, esta información en aislamientos de origen marino aún está siendo determinada. Tal característica presenta un interés particular, debido a su uso potencial en alimentos funcionales. En este trabajo, se estudió la capacidad antioxidante de 16 BAL bacteriocinogénicas provenientes de organismos marinos de la costa del Chubut (periodo 2010-2022), mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Se evaluó la capacidad antioxidante *in vitro* por medio de la reducción de 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH), actividad antioxidante reductora de iones cúpricos (CUPRAC) y barrido de radicales oxidrilos, empleando células sin lisar. Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico eucariota para valorar el efecto protector *in vivo*. Los resultados obtenidos por secuestro de radicales DPPH exhibieron valores entre 15-37.5%; el ensayo de secuestro de radicales oxidrilos mostró valores entre 13.3-61.9% y el método CUPRAC los valores variaron entre 0.223-0.551, equivalentes a mmol de ácido ascórbico por ml de suspensión celular. El efecto protector de las BAL en la supervivencia de *S. cerevisiae* presentó valores entre 36-90%. No fue posible establecer relaciones entre los valores obtenidos por distintos métodos o entre miembros del mismo género o especie; por ello, la capacidad antioxidante podría considerarse una característica dependiente de la cepa. Los resultados sugieren que la capacidad antioxidante de BAL bacteriocinogénicas de origen marino podría usarse como un carácter metabólico de selección con potencial biotecnológico en el desarrollo de alimentos funcionales.

- 1 Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew, Chubut, Argentina. [soltrelew@gmail.com](mailto:soltrelew@gmail.com)\*; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4393-3615>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5093-7796>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1089-9625>; ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-0036-0903>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9790-8511>
- 2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas Buenos Aires, Argentina.

**Palabras clave:** actividad antioxidante, alimentos funcionales, *Enterococcus*, *Lactococcus*, ambiente marino.



## ABSTRACT

The antioxidant activity of lactic acid bacteria (LAB) has been studied in depth in strains isolated from terrestrial organisms and fermented or unprocessed foods; however, information on isolates of marine origin is still being determined. This feature is of particular interest due to its potential use in functional foods in this work. The antioxidant capacity of 16 bacteriocinogenic LAB isolated from marine organisms from the Chubut coast (2010-2022 period) was studied with *in vivo* and *in vitro* assays. The *in vitro* antioxidant capacity was assessed by reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), cupric ion-reducing antioxidant capacity (CUPRAC), and hydroxyl radical scavenging in unlysed cells. *Saccharomyces cerevisiae* was used as a eukaryotic biological model to evaluate the protective effect *in vivo*. The antioxidant capacity results from the DPPH radical scavenging test exhibited values between 15-37.5%, while hydroxyl radical scavenging showed values between 13.3-61.9%, and, for the CUPRAC method, values varied between 0.223-0.551, equivalent to mmol of ascorbic acid per ml of cellular suspension. The LAB protective effect on the survival rate of *S. cerevisiae* displayed results between 36-90%. No relationship was established between the values obtained with the different methods or between members of the same genus or species; consequently, the antioxidant behavior could be considered strain-depend. Results suggest that the antioxidant capacity of bacteriocinogenic LAB of marine origin can be used as a metabolic selection trait with biotechnological potential in the development of functional foods.

**Keywords:** antioxidant activity, functional foods, *Enterococcus*, *Lactococcus*, marine environment.

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, las características fisiológicas de la biota que habita el ambiente marino han despertado interés, debido a su potencial uso biotecnológico en diversas áreas (Feng *et al.* 2020; Kim *et al.* 2021). En Argentina, el ecosistema marino presenta no solo una gran extensión, sino también una alta biodiversidad. Sin embargo, los microorganismos que habitan estos ecosistemas han sido poco estudiados

y su potencial biotecnológico, escasamente explorado (Dionisi *et al.* 2012).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se han utilizado para elaborar y conservar alimentos desde el comienzo de la civilización, por la capacidad de producir ácidos orgánicos que logran su preservación, así como en el desarrollo de características organolépticas. Las BAL pueden presentarse en forma fortuita como microbiota natural de los alimentos o incorporarse de manera controlada en fermentaciones industriales como

cultivos iniciadores (Łepecka *et al.* 2023). El estudio en profundidad del metabolismo de las BAL ha permitido seleccionar cepas con características funcionales para su aplicación en alimentos (Kuda *et al.* 2014; Lin *et al.* 2018). El término “alimento funcional” se introdujo por el Gobierno de Japón a mediados de 1980 (Granato *et al.* 2020) y se define como productos utilizados como parte de una dieta normal con efectos más allá de sus funciones nutricionales básicas. El mercado de alimentos funcionales está en continuo crecimiento, en relación con productos dirigidos a la salud gastrointestinal, enfocado, particularmente, en los prebióticos y probióticos (Annuziata & Vecchio, 2013).

El desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y/o radicales libres y la dificultad de su eliminación por sistemas antioxidantes genera el estrés oxidativo de un organismo (Łepecka *et al.* 2023). Las modificaciones por reacciones de oxidación que sufren el ADN, proteínas, lípidos y otras moléculas pequeñas por ROS desempeñan un papel importante en el desarrollo de enfermedades comunes y afecciones degenerativas relacionadas con la edad (Wen *et al.* 2013; Kuda *et al.* 2014).

Durante los últimos años, ha tomado un especial interés la búsqueda de nuevos antioxidantes que sean seguros para su uso en alimentos; en particular las BAL y sus metabolitos se

han reconocido como fuentes efectivas. La mayoría de las BAL tiene sistemas que eliminan los radicales libres de oxígeno, reducen su acumulación e incluso previenen su formación en el intestino, disminuyendo el estrés oxidativo (Łepecka *et al.* 2023).

El litoral marino de la Argentina constituye una fuente de BAL, provenientes de distintos vertebrados e invertebrados, que exhiben propiedades biotecnológicas aplicables en la industria alimentaria, tales como actividad antimicrobiana (Marguet *et al.* 2011; Sosa *et al.* 2022), producción de bioemulsificantes (Gianni de Carvalho *et al.* 2019; Lara *et al.* 2020), características probióticas (Sequeiros *et al.* 2010), entre otras. A lo largo de los últimos años, se ha profundizado el estudio de la capacidad antioxidante de BAL provenientes de organismos terrestres y alimentos fermentados o sin procesar; no obstante, es escasa la información sobre cepas de origen marino. En el presente estudio, se evaluó la capacidad antioxidante *in vivo* e *in vitro* de cepas de BAL bacteriocinogénicas aisladas de invertebrados y peces marinos de la costa de la provincia de Chubut (Argentina), para su posterior selección como cultivos iniciadores en alimentos funcionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 16 cepas de BAL provenientes de invertebrados y

peces marinos (Cuadro 1) de la costa de la provincia de Chubut (Patagonia-Argentina), sobre la base de su actividad antimicrobiana contra patógenos o contaminantes de alimentos de interés para la industria pesquera. Se utilizaron las cepas *Enterococcus hirae* 106, 107, 108, 463 y 471; *E. faecium* 135, 452, 459, 465 y 468, y *E. mundtii* 278 (Sosa *et al.* 2022); *Lactococcus lactis* Tw11, 12, 34 y 35 (Vallejo *et al.* 2009); y *E. mundtii* Tw56 (Schelegueda *et al.* 2015), pertenecientes al cepario del

Laboratorio de Biotecnología Bacteriana (LBB), Cátedra de Biología Celular y Molecular, FCNyCS, UNPSJB-Sede Trelew.

Para los experimentos subsecuentes, las cepas se cultivaron en 2 ml de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Biokar, Francia) a 35°C, durante 18 h sin agitación. Las células intactas se obtuvieron mediante centrifugación a 2 000 g durante 15 min y lavado con buffer PBS, procedimiento realizado dos veces. La capacidad antioxidante

Cuadro 1. Fuente y origen del aislamiento de las cepas de BAL seleccionadas para la realización del estudio

Table 1. Source and origin of isolation of selected LAB strains for the study

Cepa	Organismos	Origen	Lugar de colección
<i>Enterococcus mundtii</i> Tw56	<i>Odonthesthes platensis</i> (pejerrey panzón)	Intestino	Puerto Rawson (-43.33, -65.05)
<i>E. hirae</i> 106	<i>Hemiodema spectabilis</i> (pepino de mar)	Intestino	Playa Unión - Rawson (-43.31, -65.04)
<i>E. hirae</i> 107	<i>H. spectabilis</i>	Intestino	El sombrerito - Rawson (-43.25, -64.98)
<i>E. hirae</i> 108	Forcipulatida (estrella de mar)	Intestino	El sombrerito - Rawson
<i>E. faecium</i> 135	Forcipulatida	Intestino	Playa Unión - Rawson
<i>E. mundtii</i> 278	<i>H. spectabilis</i>	Intestino	Playa Unión - Rawson
<i>E. faecium</i> 452	<i>Mytilus edulis platensis</i> (mejilón)	Intestino	Golfo San Jorge - Comodoro Rivadavia (-45.84, -67.47)
<i>E. faecium</i> 459	<i>M. edulis platensis</i>	Intestino	Golfo San Jorge - Rada Tilly (-45.92, -67.55)
<i>E. hirae</i> 463	<i>M. edulis platensis</i>	Intestino	Golfo San Jorge - Comodoro Rivadavia
<i>E. faecium</i> 465	<i>M. edulis platensis</i>	Intestino	Playa Magagna - Rawson (-44.90, -65.60)
<i>E. faecium</i> 468	<i>M. edulis platensis</i>	Intestino	Caleta Carolina - Camarones (-44.90, -65.60)
<i>E. hirae</i> 471	<i>M. edulis platensis</i>	Intestino	Golfo San Jorge - Rada Tilly
<i>Lactococcus lactis</i> Tw11	<i>O. platensis</i>	Tegumento	Playa Magagna - Rawson
<i>L. lactis</i> Tw12	<i>O. platensis</i>	Tegumento	Playa Magagna - Rawson
<i>L. lactis</i> Tw34	<i>O. platensis</i>	Intestino	Playa Magagna - Rawson
<i>L. lactis</i> Tw35	<i>O. platensis</i>	Tegumento	Playa Magagna - Rawson

en células intactas se determinó *in vitro*, con la técnica de actividad antioxidante por reducción de 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH), reacción de secuestro de radicales oxidrilos y la capacidad antioxidante reductora de iones cúpricos (CUPRAC). Además, se evaluó *in vivo* el efecto protector de las BAL contra el peróxido de hidrógeno, por medio del uso de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariota.

### Actividad antioxidante por reducción de 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH)

El ensayo de DPPH se realizó según lo propuesto por Zhang *et al.* (2013). Las células se resuspendieron con 2 ml de la solución de DPPH y se incubaron en oscuridad durante 30 min. Luego de centrifugar a 6 000 g durante 5 min, se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 517 nm, utilizando un espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Vis). El porcentaje de reducción del DPPH se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Barrido de radicales DPPH (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

$A_{\text{control}}$  (absorbancia de la solución de DPPH); y  $A_{\text{muestra}}$  (DPPH con suspensión celular).

### Capacidad antioxidante reductora de iones cúpricos (CUPRAC)

Se resuspendieron las células en 3 ml de reactivo de trabajo compuesto de la siguiente manera: 1 ml neocuproina

(1 mg\*ml en etanol<sup>-1</sup>), 1.5 ml de buffer acetato de sodio (0.05 M y pH 6.0) y 0.5 ml de solución de CuCl<sub>2</sub> (0.01 M). Se incubó en oscuridad durante 1 h y se centrifugó a 12 000 g durante 2 min. Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 450 nm y los resultados se expresaron como mmol equivalentes de ácido ascórbico por ml de suspensión (mmol ácido ascórbico\*ml de suspensión<sup>-1</sup>), según lo propuesto por Apak *et al.* (2004).

### Actividad antioxidante por secuestro de radicales oxidrilos

Se realizó el ensayo, acorde con el protocolo establecido por Zhang *et al.* (2021), con algunas modificaciones: se resuspendieron las células en la mezcla de reacción compuesta por 1 ml de 1,10-fenantrolina (0.75 mM), 1 ml de FeSO<sub>4</sub> (0.75 mM) y 2 ml de buffer fosfato de sodio (0.2 M). Se adicionó 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01% v/v) al inicio de la reacción y se incubó durante 90 min a 37°C. Posteriormente, se centrifugó a 12 000 g durante 4 min y se midió la absorbancia a 508 nm. Se calculó el porcentaje de secuestro de radicales OH<sup>•</sup> mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Secuestro de radicales OH (\%)} = \frac{(A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}) \times 100}{(A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}})}$$

$A_{\text{blanco}}$ : absorbancia de la mezcla de reacción;  $A_{\text{control}}$ : absorbancia de la mezcla de reacción y peróxido de hidrógeno; y  $A_{\text{muestra}}$ : absorbancia de la mezcla de reacción y el cultivo celular.

## Actividad antioxidante *in vivo*

Se evaluó el efecto protector de las BAL frente a la toxicidad oxidativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre *Saccharomyces cerevisiae* LTw3, a través del método propuesto por Lin *et al.* (2018) con modificaciones. El pellet de BAL se resuspendió en 2 ml de agua destilada estéril. Luego, se añadieron 600 µl de cada suspensión de BAL a 5 ml de agua destilada estéril y se calentó a 100°C durante 20 min. Cuando la temperatura descendió a un rango de 30-35°C, se agregaron 50 µl de un cultivo de *S. cerevisiae* LTw3 y se incubó durante 90 min. Seguidamente, se adicionaron 280 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM). Se realizaron dos controles en ausencia de BAL: uno para evaluar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la viabilidad de los organismos (C2) y otro sin el agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para valorar el crecimiento de la levadura (C1). Posterior a la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las suspensiones se incubaron durante 90 min a 35°C. Después de este tratamiento, se tomaron 100 µl de las suspensiones y se diluyeron en 5 ml de agua destilada estéril. Se sembraron 100 µl de las diluciones en agar GPY (Difco, EE. UU.) y se incubaron durante 48 h a 35°C, para su posterior recuento. Con el fin de determinar la tasa de supervivencia de la levadura *S. cerevisiae*, se utilizó la siguiente relación:

$$\text{Tasa de supervivencia (\%)} = \frac{\text{Recuento de la muestra}^*}{\text{Recuento del control (C1)}} \times 100$$

\*Cultivo de levaduras, con agregado de peróxido de hidrógeno y suspensión de BAL tratadas térmicamente descritas por Kuda *et al.* 2014.

## Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron de manera independiente y por triplicado. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante el test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se utilizó el *software* estadístico STATGRAPHICS Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc. 2006).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microorganismos que presentan capacidad antioxidante, mediante la producción de metabolitos y/o presencia de componentes en su superficie celular, podrían disminuir o anular el efecto negativo de los ROS (Bhagwat & Annapure, 2019). En este estudio, se evaluaron diferentes ensayos *in vitro*. En el Cuadro 2, se observan los porcentajes de barrido de DPPH y radicales oxidrilos, comprendidos entre un 15-37.5% y 13.3-61.9%, respectivamente.

La evidencia de actividad antioxidante por el método de DPPH se observa por medio de la interacción de radicales libres con compuestos de carácter antioxidante donantes de protones, que ocasiona un descenso en la

**Cuadro 2. Determinación de la actividad antioxidante de las células de BAL seleccionadas por métodos DPPH y secuestro de radicales oxidrilos**

**Table 2. Determination of antioxidant activity of LAB cells selected using the DPPH and scavenging of hydroxyl radicals methods**

Cepas	Actividad antioxidante	
	Tasa de barrido de DPPH (%)	Tasa de barrido de radicales oxidrilo (%)
<i>Enterococcus mundtii</i> Tw56	21.2 ± 1.8 <sup>bcd</sup>	20.4 ± 2.6 <sup>abc</sup>
<i>E. hirae</i> 106	37.5 ± 5.1 <sup>f</sup>	28.4 ± 3.4 <sup>cde</sup>
<i>E. hirae</i> 107	17.2 ± 1.5 <sup>abc</sup>	40.9 ± 5.0 <sup>ef</sup>
<i>E. hirae</i> 108	36.8 ± 4.7 <sup>f</sup>	44.8 ± 5.6 <sup>f</sup>
<i>E. faecium</i> 135	26.4 ± 1.4 <sup>de</sup>	21.1 ± 5.1 <sup>abcd</sup>
<i>E. mundtii</i> 278	35.2 ± 4.5 <sup>f</sup>	22.7 ± 3.3 <sup>bcd</sup>
<i>E. faecium</i> 452	22.4 ± 1.1 <sup>cd</sup>	61.9 ± 4.2 <sup>g</sup>
<i>E. faecium</i> 459	36.0 ± 3.7 <sup>f</sup>	33.9 ± 1.8 <sup>e</sup>
<i>E. hirae</i> 463	20.1 ± 1.5 <sup>a</sup>	32.8 ± 5.1 <sup>cde</sup>
<i>E. faecium</i> 465	32.0 ± 1.6 <sup>ef</sup>	31.9 ± 6.3 <sup>e</sup>
<i>E. faecium</i> 468	23.1 ± 2.3 <sup>cd</sup>	21.7 ± 6.8 <sup>bcd</sup>
<i>E. hirae</i> 471	21.4 ± 0.6 <sup>bcd</sup>	29.0 ± 7.5 <sup>de</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> Tw11	21.5 ± 2.9 <sup>bcd</sup>	13.3 ± 1.0 <sup>a</sup>
<i>L. lactis</i> Tw12	18.6 ± 2.0 <sup>abc</sup>	28.7 ± 7.9 <sup>de</sup>
<i>L. lactis</i> Tw34	15.7 ± 1.2 <sup>ab</sup>	17.4 ± 1.1 <sup>ab</sup>
<i>L. lactis</i> Tw35	25.2 ± 0.8 <sup>d</sup>	17.8 ± 3.1 <sup>ab</sup>

Los resultados obtenidos equivalen al promedio y a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las medias con diferentes letras indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).

absorbancia con respecto al control (Bhagwat & Annapure, 2019). A partir de los resultados obtenidos de DPPH, se pueden agrupar las siguientes cepas, en función de su mayor capacidad antioxidante: *E. faecium* 459 y 465, *E. mundtii* 278 y *E. hirae* 106 y 108, todas ellas provenientes de invertebrados marinos, que presentan diferencias significativas con las demás cepas pertenecientes al género ( $P \leq 0.05$ ). En el género *Lactococcus*, la cepa *L. lactis* Tw 35, proveniente del tegumento de *Odonthesthes platensis*, exhibe una mayor capacidad antioxidante ( $P \leq$

0.05). Las restantes BAL evaluadas presentan variaciones en los resultados, independientemente de la cepa y el organismo de origen del aislamiento.

Resultados similares fueron obtenidos por Bhagwat & Annapure (2019), quienes evaluaron la actividad antioxidante por medio de la técnica de DPPH en cepas de *Enterococcus* de origen humano, con valores variables para las especies evaluadas. A diferencia de lo obtenido en este estudio, las cepas evaluadas por Rezaei et al. (2020) exhiben una capacidad antioxidante entre 40-60% para *Lactococcus*

*lactis* y de 58% para *Enterococcus faecium* aislados de leche de camello.

La reacción de Fenton se basa en la oxidación de iones  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  mediada por la acción del peróxido de hidrógeno, lo cual da como resultado radicales  $OH\cdot$ . Estas especies reactivas del oxígeno ocasionan daños en el ADN y producen la peroxidación de lípidos (Lin *et al.* 2018). A partir del análisis de los datos de barrido de radicales oxidrilos, se destaca la cepa *E. faecium* 452, aislada de *Mytilus edulis platensis*, que presentó un 62% de actividad antioxidante, significativamente diferente al resto de las especies estudiadas pertenecientes al género *Enterococcus* ( $P \leq 0.05$ ). Este resultado supera al porcentaje obtenido por Lin *et al.* (2018) para cepas de *Lactobacillus plantarum*, con valores de secuestro de radicales oxidrilos en un rango entre 7.08-49.60%, y *Pediococcus pentosaceus*, de 26.45%. También podemos destacar como microorganismos promisorios a *E. hirae* 107 con actividad antioxidante de un 40.9% y *E. hirae* 108 con 44.8%, aisladas de pepino de mar (*Hemiodema spectabilis*) y de estrella de mar (orden Forciculatida), respectivamente. En relación con el género *Lactococcus*, se destaca *L. lactis* Tw 12, que exhibió un porcentaje de secuestro de radicales oxidrilos de 28.7%, valor notablemente distinto, comparado con las demás cepas pertenecientes al género ( $P \leq 0.05$ ). Se debe resaltar que *L. lactis* Tw 35 mostró mayor capacidad antioxidante

en DPPH, comparado con integrantes de su mismo género; sin embargo, se obtuvo uno de los valores más bajos cuando se utilizó la técnica de secuestro de radicales oxidrilos. En las demás cepas ensayadas, se obtuvieron valores variables, independientemente del género y de la especie, como también del organismo del que fueron aislados.

En el Cuadro 3, se observan los resultados de capacidad antioxidante determinados por el método CUPRAC. Las cepas exhiben una capacidad antioxidante entre 0.233-0.551 equivalentes mmol de ácido ascórbico\*ml de suspensión<sup>-1</sup>. En el género *Enterococcus*, se destacan las cepas de *E. mundtii* Tw56 aislada de *O. platensis*, *E. hirae* 108 y *E. faecium* 465, ambas provenientes de invertebrados marinos; mientras que para el género *Lactococcus*, la cepa *L. lactis* Tw12 aislada de *O. platensis* exhibió la mayor capacidad antioxidante ( $P \leq 0.05$ ). Las restantes cepas de BAL evaluadas presentan variaciones en los resultados, independientemente del género, de la especie y del organismo de aislamiento (peces o invertebrados).

Los resultados obtenidos equivalen al promedio y a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las medias con diferentes letras indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).

El ensayo CUPRAC es un método utilizado para el análisis de la actividad antioxidante de matrices



Cuadro 3. Determinación de actividad antioxidante de las células de BAL seleccionadas por el método CUPRAC  
Table 3. Determination of antioxidant activity of LAB cells selected using the CUPRAC method

Cepas	Capacidad antioxidante (Eq. mmol ácido ascórbico.ml de suspensión <sup>-1</sup> )
<i>Enterococcus mundtii</i> Tw56	0.472 ± 0.036 <sup>eh</sup>
<i>E. hirae</i> 106	0.429 ± 0.055 <sup>efg</sup>
<i>E. hirae</i> 107	0.421 ± 0.008 <sup>defg</sup>
<i>E. hirae</i> 108	0.441 ± 0.123 <sup>fg</sup>
<i>E. faecium</i> 135	0.406 ± 0.018 <sup>cdefg</sup>
<i>E. mundtii</i> 278	0.417 ± 0.035 <sup>cdefg</sup>
<i>E. faecium</i> 452	0.387 ± 0.046 <sup>cdef</sup>
<i>E. faecium</i> 459	0.352 ± 0.055 <sup>bc</sup>
<i>E. hirae</i> 463	0.360 ± 0.030 <sup>cd</sup>
<i>E. faecium</i> 465	0.511 ± 0.063 <sup>h</sup>
<i>E. faecium</i> 468	0.411 ± 0.083 <sup>cdefg</sup>
<i>E. hirae</i> 471	0.372 ± 0.008 <sup>cde</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> Tw11	0.233 ± 0.013 <sup>a</sup>
<i>L. lactis</i> Tw12	0.383 ± 0.051 <sup>cdef</sup>
<i>L. lactis</i> Tw34	0.280 ± 0.028 <sup>a</sup>
<i>L. lactis</i> Tw35	0.274 ± 0.041 <sup>ab</sup>

Los resultados obtenidos equivalen al promedio y a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las medias con diferentes letras indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).

alimentarias y extractos biológicos. Está basado en una transferencia simple de electrones y mide el poder reductor de los compuestos antioxidantes para convertir los iones  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ . Este es considerado una variación del ensayo FRAP, con el cual se evalúa la reducción del ion  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  (Shahidi & Zhong, 2015). Mu *et al.* (2019) realizaron un ensayo con células intactas, mediante la técnica FRAP, para examinar la actividad antioxidante de la cepa *L. plantarum* Y44. No obstante, sus resultados no serían comparables con los obtenidos en este trabajo, debido a las diferencias entre los iones metálicos,

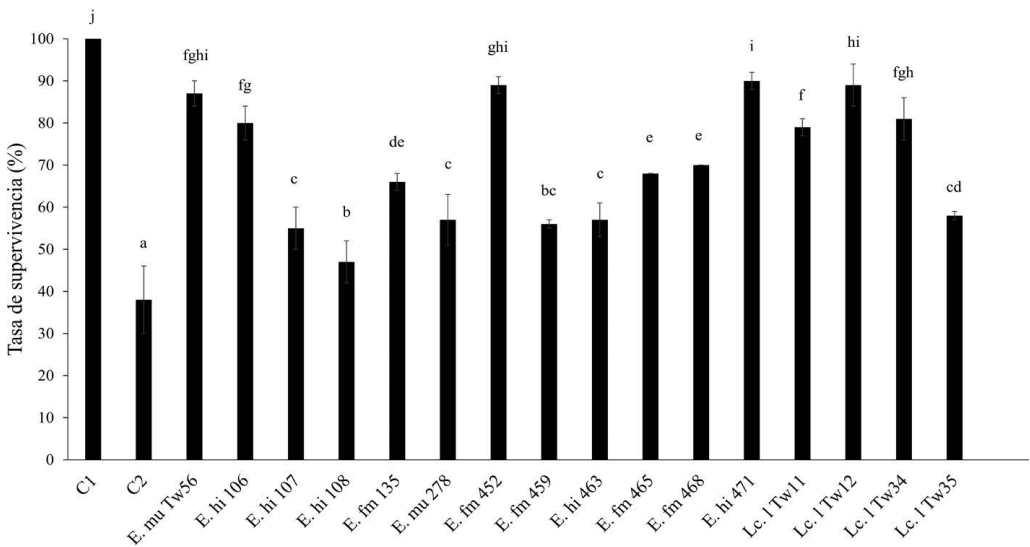
como también al pH del medio utilizado para la reacción, ya que la técnica FRAP es efectuada en un medio ácido (pH = 3.6) y el ensayo CUPRAC es llevado a cabo a pH neutro. Este último podría simular de mejor manera la acción fisiológica de la actividad antioxidante (Özyürek *et al.* 2011).

Las BAL, como otros microorganismos, presentan la capacidad de capturar iones metálicos, que se unen a la pared celular o polisacáridos extracelulares, mediante la adsorción, cambios iónicos, formación de complejos, quelación o microprecipitación. El secuestro de iones metálicos ocurre por biosorción (la unión de iones metálicos a la pared celular sin que medien procesos metabólicos) y la bioacumulación (proceso mediado por el metabolismo, en el cual los iones metálicos se acumulan dentro de la célula) (Mrvčić *et al.* 2012).

En la Figura 1, se observan los resultados de la tasa de supervivencia de *S. cerevisiae* LTW3 al tratamiento con

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM). El control con adición de peróxido de hidrógeno mostró una reducción de la viabilidad del 64%, mientras que se observó un efecto protector mediante las suspensiones celulares tratadas térmicamente de las cepas de BAL ensayadas ( $P \leq 0.05$ ). La levadura *S. cerevisiae* es utilizada para el estudio de viabilidad replicativa y cronológica celular; se considera un modelo biológico simple para la evaluación de actividad antioxidante, debido a su susceptibilidad al peróxido de hidrógeno (Lin *et al.* 2018). De

acuerdo con los resultados de porcentaje de viabilidad, se destacan entre las cepas pertenecientes al género *Enterococcus*: *E. hirae* 471, *E. faecium* 452 y *E. mundtii* Tw56; y de las cepas que forman parte del género *Lactococcus*, se destaca *L. lactis* Tw12, todas con un efecto protector superior al 80%. Estos resultados son comparables con lo registrado por Lin *et al.* (2018), quienes obtuvieron un efecto protector del 79.91% para la cepa *L. plantarum* AR113. Sin embargo, se observan diferencias con lo obtenido por Kuda *et al.*



E. fm: *Enterococcus faecium*; E. fl: *E. faecalis*; E. mu: *E. mundtii*; E. hi: *E. hirae*; Lc. l: *Lactococcus lactis*; C1: control sin adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; C2: control con adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Fig. 1. Actividad antioxidante *in vivo* de las cepas seleccionadas. Los resultados obtenidos equivalen al promedio y a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las medias con diferentes letras indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ )

Fig. 1. *In vivo* antioxidant activity of selected strains. Results obtained are equivalent to the average and standard deviation of three independent assays. The means with different letters correspond to significant differences ( $P \leq 0.05$ )

(2014), quienes reportan un efecto protector menor al 70% para *P. pentosaceus*, *L. lactis* y cepas de *L. plantarum*.

Es importante destacar que no existe una relación directa entre las técnicas *in vitro* e *in vivo* de las BAL seleccionadas en este estudio. Entre las cepas evaluadas se resalta el comportamiento de *E. hirae* 108, que en los ensayos *in vitro* demostró ser potencialmente promisorio; pero, en el modelo *in vivo* presentó un menor efecto protector comparado con las restantes BAL. Contrariamente, la cepa *L. lactis* Tw12 exhibió un bajo porcentaje de secuestro de radicales DPPH, valores intermedios en los ensayos de secuestro de radicales oxidrilos y CUPRAC, mientras que en el modelo *in vivo* resultó ser una de las cepas con mayor efecto protector (89%). Datos similares son reportados en el trabajo de Kuda *et al.* (2014), en el cual la cepa *P. pentosaceus* S-SU6 presentó valores inferiores en los ensayos *in vitro*, pero demostró el mayor efecto protector frente al modelo eucariota de *S. cerevisiae* comparado con las cepas estudiadas en ese trabajo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo y lo observado por otros autores (Lepecka *et al.* 2023), se podría considerar que la capacidad antioxidante es dependiente de la cepa; microorganismos identificados bajo la misma especie exhiben diferentes resultados, según las técnicas realizadas. Además, como lo han

sugerido Bhagwat & Annapure (2019), se deben realizar diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, debido a los distintos sistemas de barrido de radicales presentes en los microorganismos. En futuros estudios, se deberían valorar los procesos de regulación enzimáticos relacionados con la actividad antioxidante, como también la naturaleza de los compuestos que otorgan dicha característica con potencial biotecnológico.

## CONCLUSIONES

Mediante las evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de los cultivos celulares de las 16 cepas provenientes de organismos marinos, se determinó que la capacidad antioxidante es variable y dependiente de las cepas e independiente del origen del aislamiento. Particularmente, las cepas *E. hirae* 471, *E. faecium* 452, *E. mundtii* Tw56 y *L. lactis* Tw12 podrían ser consideradas BAL promisorias para su utilización en alimentos funcionales, de acuerdo con su efecto protector evaluado en *S. cerevisiae*. Mientras que, las cepas *E. hirae* 106, 107, 108, *E. mundtii* 278, *E. faecium* 465 y *L. lactis* Tw 35 se podrían utilizar como cultivos iniciadores en procesos fermentativos, debido a la producción de metabolitos con capacidad antioxidante, según lo obtenido en los ensayos *in vitro*. La capacidad antioxidante ejercida por las

cepas bacteriocinogénicas de origen marino podría considerarse un rasgo metabólico adicional de selección para evaluar el potencial biotecnológico en procesos fermentativos y desarrollo de alimentos funcionales.

## REFERENCIAS

- Annuziata, A. & Vecchio, R. (2013). Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. *Food Qual. Prefer.*, 28(1), 348-355. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.10.009>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7970-7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Bhagwat, A. & Annapure, U. S. (2019). *In vitro* assessment of metabolic profile of *Enterococcus* strains of human origin. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 17(11), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0009-0>
- Dionisi, H., Lozada, M. & Olivera, N. (2012). Bioprospection of marine microorganisms biotechnological applications and methods. *Rev. Argent. Microbiol.*, 44, 49-60.
- Feng, J., Cai, Z., Chen, Y., Zhu, H., Chang, X., Wang, X. & Nie, G. (2020). Effects of an exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* Z-2 on innate immune response, antioxidant activity, and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Cyprinus carpio* L. *Fish Shellfish Immunol.*, 98, 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.01.037>
- Gianni de Carvalho, K., Gómez, J., Vallejo, M., Marguet, E., Peroti, N., Donato, M., ... & Colin, V. (2019). Production and properties of a bioemulsifier obtained from a lactic acid bacterium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 183, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109553>
- Granato, D., Barba, F., Bursac-kovačević, D., Lorenzo, J., Cruz, A. & Putnik, P. (2020). Annual Review of Food Science and Technology Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annu Rev Food Sci Technol*, 11(3), 93-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
- Kim, S., Jeon, H., Han, H. & Hur, J. (2021). Evaluation of *Bacillus albus* SMH-1 and *B. safensis* SMG-2 isolated from Saemangeum Lake as probiotics for aquaculture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquac. Rep.*, 20, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100743>
- Kuda, T., Kawahara, M., Nemoto, M., Takahashi, H. & Kimura, B. (2014). *In vitro* antioxidant and anti-inflammation properties of lactic acid bacteria isolated from fish intestines and fermented fish from the Sanriku *Satoumi* region in Japan. *Food Res. Int.*, 64, 248-255. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.028>
- Lara, V., Vallejo, M., Parada, R., Henao Ossa, J., Gliemmo, M. & Campos, C. (2020). Characterization of the emulsifying activity of biosurfactants produced by lactic acid bacteria isolated from the Argentinian Patagonia. *J. Dispers. Sci. Technol.*, 46(6), 902-909. <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1845961>
- Lepecka, A., Szymański, P., Okoń, A., Ziełńska, D. (2023). Antioxidant activity of environmental lactic acid bacteria strains isolated from organic raw fermented meat products. *LWT - Food*

- Sci. Technol.*, 174, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114440>
- Lin, X., Xia, Y., Wang, G., Yang, Y., Xiong, Z., Lv, F. & Ai, L. (2018). Lactic acid bacteria with antioxidant activities alleviating oxidized oil induced hepatic injury in mice. *Front. Microbiol.*, 9, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02684>
- Marguet, E., Vallejo, M., Chichisola, V. & Quispe, J. (2011). Actividad antagonista de bacterias lácticas aisladas del medio marino contra cepas de *Listeria*. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.*, 45(2), 305-310.
- Mrvčić, J., Stanzer, D., Šolić, E. & Stehlik-Tomas, V. (2012). Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: Opportunities for improving food safety and quality. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28(9), 2771-2782. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1094-2>
- Mu, G., Li, H., Tuo, Y., Gao, Y. & Zhang, Y. (2019). Antioxidative effect of *Lactobacillus plantarum* Y44 on 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (ABAP)-damaged Caco-2 cells. *J. Dairy Sci.*, 102(8), 6863-6875. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16447>
- Özyürek, M., Güçlü, K. & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends Analyt. Chem.*, 30(4), 652-664. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.016>
- Rezaei, M., Noori, N., Shariatifar, N., Gandomi, H., Akhondzadeh Basti, A. & Mousavi Khaneghah, A. (2020). Isolation of lactic acid probiotic strains from Iranian camel milk. *Food Sci. Technol.*, 132, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109823>
- Schelegueda, L. I., Vallejo, M., Gliemmo, M. F., Marguet, E. R. & Campos, C. A. (2015). Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of a bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* isolated from *Odontesthes platensis*. *LWT - Food Sci. Technol.*, 64, 794-801. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.017>
- Sequeiros, C., Vallejo, M., Marguet, E. R. & Olivera, N. L. (2010). Inhibitory activity against the fish pathogen *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish. *Arch. Microbiol.*, 192, 237-245. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0552-1>
- Shahidi, F. & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods*, 18, 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Sosa, F. M., Parada, R. B., Marguet, E. R. & Vallejo, M. (2022). Utilization of agro-industrial byproducts for bacteriocin production using *Enterococcus* spp. strains isolated from patagonian marine invertebrates. *Curr. Microbiol.*, 79, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02712-5>
- StatPoint Technologies, Inc. (2006). *Statgraphics centurion XV user manual*. The Plains, VA: StatPoint Technologies, Inc. <https://www.statgraphics.com/>
- Vallejo, M., Olivera, N., Sequeiros, C. & Marguet, E. (2009). Actividad antilisteria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos. *Analect. Vet.*, 29(2), 19-23.
- Wen, X., Wu, J., Wang, F., Liu, B., Huang, C. & Wei, Y. (2013). Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, 65, 402-410. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.013>

- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zeng, X., Yang, Z. & Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *Int. J. Biol. Macromol.*, 54, 270-275. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.037>
- Zhang, Y., Chen, X., Hu, P., Liao, Q., Luo, Y., Li, J., Feng, D., ... & Xu, H. (2021). Extraction, purification, and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus kimchi* SR8 from sour meat *in vitro* and *in vivo*. *Cy T A - J. Food*, 19(1), 228-237. <https://doi.org/10.1080/19476337.2021.1883117>