



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

KARINE DA CUNHA SCHMIDT

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CORANTES NATURAIS EM BACTÉRIAS
ISOLADAS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Recife/PE

2016

KARINE DA CUNHA SCHMIDT

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CORANTES NATURAIS EM BACTÉRIAS
ISOLADAS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Brígida T. Luckwu de Lucena

Recife/PE

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Schmidt, Karine da Cunha

**Avaliação da produção de corantes naturais em bactérias isoladas do
Semiárido brasileiro / Karine da Cunha Schmidt- Recife: O Autor, 2016.**

66 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientadora: Brígida T. Luckwu de Lucena

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biotecnologia Industrial, 2016.

Inclui referências

**1. Bactérias 2. Corantes 3. Caatinga I. Silva, Márcia Vanusa da
(orientadora) II. Lucena, Brígida T. Luckwu de (coorientadora) III.
Título**

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-273

KARINE DA CUNHA SCHMIDT

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CORANTES NATURAIS EM
BACTÉRIAS ISOLADAS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Brígida T. Luckwu de Lucena

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva
(Universidade Federal de Pernambuco)

Prof^a. Dr^a. Thayza Christina Montenegro Stamford
(Universidade Federal de Pernambuco)

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Dedico a todos que contribuíram
com este trabalho e em especial a minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, pelo Seu amor e por zelar por minha vida todos os dias.

À minha família, pelo carinho, dedicação e apoio fundamentais para eu vencer os obstáculos e obter esta conquista.

À minha orientadora Professora Dr^a Márcia Vanusa da Silva pelo apoio, atenção e confiança para a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Professora Dr^a Brígida de Lucena pela atenção, apoio e auxílio nas análises moleculares.

À Professora Dr^a Tânia Stamford pelo seu apoio e por ter disponibilizado seu laboratório de microbiologia no departamento de nutrição nos primeiros meses de execução dos experimentos.

Ao Dr. Esteban Vidal, pesquisador do CETENE, pela atenção e disponibilidade na realização das análises cromatográficas em Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

À Professora Dr^a Gláucia Lima pela atenção e disponibilidade na realização dos testes bioquímicos.

À todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial.

Aos colegas de laboratório e técnicos pela colaboração e companhia.

Aos amigos, Douglas Andrade, Fernanda Luizy, Karol Spinelli e Wellington Silva, pelo companheirismo e apoio nas horas de dificuldade.

À agência de fomento CAPES pela concessão da bolsa de fomento.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho.

“O futuro não é um lugar para onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando, e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quanto o destino”.

(Autor Desconhecido)

RESUMO

Os carotenoides pertencem a um grupo de corantes naturais amplamente distribuídos na natureza e desempenham importantes funções biológicas em seres humanos. A produção microbiana destes corantes tem despertado a atenção da indústria devido a utilização de processos fermentativos, que podem ser controlados em ambientes fechados independente de condições climáticas. *Micrococcus luteus* é uma actinobactéria que produz um carotenoide amarelo denominado sarcinaxantina que possui maior quantidade de carbonos, duplas ligações conjugadas e grupos hidroxilas, o que contribui para sua maior capacidade antioxidante. Sendo assim, este estudo teve como objetivos: realizar a triagem de bactérias produtoras de corantes naturais isoladas do Semiárido cedidas pelo Grupo de Diversidade e Biotecnologia de Microorganismos (GDBM) do Laboratório de Biologia Molecular da UEPB – Campus V; obter o extrato bruto de *Micrococcus luteus* e caracterizar os carotenoides por técnica cromatográfica; avaliar a atividade antioxidante e a eficácia fotoprotetora do extrato bruto *in vitro* de *Micrococcus luteus*. Para atingir os objetivos, os isolados bacterianos pigmentados do Semiárido foram identificados por 16S rDNA e dois isolados de *Micrococcus luteus* (FT5.10 e FT9.12) foram selecionados para extração em metanol e posterior caracterização dos carotenoides por método cromatográfico e análise das suas atividades biológicas. Os dois isolados foram submetidos a provas bioquímicas sendo caracterizados como Gram-positivos, cocóides e catalase positivos. Eles foram submetidos a fermentação submersa a 30°C, a 180 rpm por 72h e apresentaram o máximo de produção de pigmento durante a fase estacionária. Para a determinação da atividade antioxidante, os extratos metanólicos brutos de *M.luteus* foram submetidos aos métodos DPPH e ABTS: o método DPPH exibiu 60,16(±1,14) % e 76,06(±2,2) % de capacidade de sequestro de radicais livres para os extratos metanólicos dos isolados FT5.10 e FT9.12 na concentração 1000 µg/mL, respectivamente. O método ABTS exibiu o valor de 40,22(±2,272) % e 63,82(±4,233) % de capacidade de sequestro de radicais livres para os extratos metanólicos dos isolados FT5.10 e FT9.12, respectivamente, na concentração de 1000µg/mL. O valor de Fator de Proteção Solar (FPS) foi de 4,26(±0,83) e 3,59(±0,64) para os extratos metanólicos dos isolados FT5.10 e FT9.12, respectivamente. Os resultados sugerem que os extratos obtidos de *M. luteus* são uma fonte promissora de corantes naturais, exibem potencial para atuarem como antioxidantes e que possuem potencial para atuar como compostos bioativos em formulações fotoprotetoras.

Palavras-chave: *Micrococcus luteus*, sarcinaxantina, corantes naturais, processos fermentativos, Caatinga.

ABSTRACT

Carotenoids belong to a group of natural dyes widely distributed in nature and carry out important biological functions in humans. Microbial production of these dyes has aroused the attention of the industry due to the use of fermentation processes, which can be controlled indoors, regardless of climatic conditions. *Micrococcus luteus* is an actinobacteria which produces a yellow carotenoid denominated sarcinaxanthin that has a higher amount of carbon, conjugated double bonds and hydroxyl groups, which contribute to its greater antioxidant capacity. Thus, this study aimed to: carry out the screening of bacteria producing natural dyes isolated Semi-Arid provided by the Group Diversity and Biotechnology of Microorganisms (GDBM) of Molecular Biology Laboratory UEPB - Campus V; obtain the crude extract of *Micrococcus luteus* and characterize the carotenoid by chromatographic technique; evaluate the antioxidant activity and photoprotective efficiency of the crude extract *in vitro* by *Micrococcus luteus*. To achieve the objectives, the bacterial isolates pigmented Semiarid were identified by 16S rDNA and two isolates of *M. luteus* (FT5.10 and FT9.12) were selected for extraction in methanol and subsequent characterization of carotenoid by chromatographic method and analysis of its biological activities. The two isolates were subjected to biochemical tests being characterized as Gram-positive, coccoid and catalase positive. They were submitted to a submerged fermentation at 30°C, 180 rpm for 72h and showed the maximum pigment production during stationary phase. To determine the antioxidant activity of the crude methanolic extracts of *M. luteus* they were submitted to the methods DPPH and ABTS: the DPPH method exhibited 60.16 (± 1.14) % and 76.06 (± 2.2) % of free radical sequestration capacity for the methanolic extracts of the isolates FT5.10 and FT9.12 at the concentration of 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. The ABTS method showed the value of 40.22 (± 2.272) % and 63.82 (± 4.233) % of free radical sequestration capacity for the methanolic extracts of the isolates FT5.10 and FT9.12, respectively, at the concentration of 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The Sun Protection Factor value (FPS) was 4.26 (± 0.83) and 3.59 (± 0.64) for the methanolic extracts of isolated FT5.10 and FT9.12 respectively. The results suggest that extracts obtained from *M. luteus* are a promising source of natural dyes, exhibit the potential to act as antioxidants and have the potential to act as bioactive compounds in photoprotective formulations.

Key-words: *Micrococcus luteus*, sarcinaxanthin, natural dyes, fermentation processes, Caatinga

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
4.1 Bioma Caatinga.....	19
4.2 Actinobactérias.....	21
4.3 <i>Micrococcus luteus</i>	21
4.4 Carotenoides.....	22
4.4.1 Via biossintética dos carotenoides.....	24
4.5 Antioxidantes.....	26
4.5.1 Radicais livres e estresse oxidativo.....	26
4.5.2 Atividade antioxidante.....	27
4.5.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	28
4.6 Proteção solar.....	29
4.6.1 Radiação solar e ultravioleta.....	29
4.6.2 Efeitos da radiação ultravioleta.....	29
4.6.3 Fotoproteção.....	30
4.6.4 Fator de Proteção Solar (FPS).....	31
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1 Triagem das bactérias produtoras de corantes naturais isoladas do Semiárido.....	33
5.1.1 Identificação molecular.....	33
5.1.1.1 Extração de DNA cromossomal (genômico).....	33
5.1.1.2 Amplificação do gene 16S rDNA por PCR.....	34
5.1.1.3 Purificação e sequenciamento do DNA.....	34
5.1.1.4 Alinhamento múltiplo das sequencias de <i>Micrococcus luteus</i>	34
5.1.1.5 REP-PCR.....	34
5.1.1.6 Análises dos dados.....	35
5.2 Manutenção dos microrganismos.....	35

5.3 Provas de identificação bioquímica.....	36
5.4 Cinética de crescimento <i>versus</i> produção de pigmento.....	36
5.4.1 Preparação do pré-inoculo.....	36
5.4.2 Cinética de crescimento.....	36
5.4.3 Produção de pigmento.....	37
5.5 Obtenção do extrato bruto.....	37
5.6 Caracterização dos pigmentos carotenoides por HPLC.....	38
5.7 Atividades antioxidantes.....	38
5.7.1 Método DPPH.....	38
5.7.2 Método ABTS.....	38
5.8 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS).....	39
5.9 Análises estatísticas.....	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6.1 Identificação molecular.....	40
6.2 Provas para identificação bioquímica.....	42
6.3 Cinética de crescimento <i>versus</i> produção de pigmento.....	43
6.4 Caracterização dos pigmentos carotenoides por HPLC.....	45
6.5 Atividades antioxidantes.....	48
6.5.1 Método DPPH.....	49
6.5.2 Método ABTS.....	50
6.6 Determinação do Fator de proteção Solar (FPS).....	51
7. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da localização do Bioma Caatinga.....	19
Figura 2: Vegetação do Bioma Caatinga.....	20
Figura 3: Estrutura química da sarcinaxantina.....	23
Figura 4: Estruturas químicas do licopeno, do γ -caroteno e do β -caroteno.....	25
Figura 5: Fluxograma dos estágios da biossíntese de carotenoide.....	26
Figura 6: Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.....	28
Figura 7: Estabilização do radical ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	29
Figura 8: Penetração dos raios UVA e UVB na pele humana.....	30
Figura 9: Cultura dos isolados FT5.10 (a) e FT9.12 (b) em meio TSB ágar.....	35
Figura 10: Fermentação submersa de isolado bacteriano.....	36
Figura 11: Alinhamento das sequencias dos doze isolados de <i>Micrococcus luteus</i> através da ferramenta MEGA 6.0.....	40
Figura 12: Perfis genéticos das linhagens de <i>Micrococcus luteus</i>	41
Figura 13: Teste da bacitracina.....	42
Figura 14: Teste da hidrólise da esculina.....	42
Figura 15: Cinética de crescimento do isolado FT5.10.....	43
Figura 16: Cinética de crescimento do isolado FT9.12.....	44
Figura 17: Produção de pigmento do isolado FT5.10.....	44
Figura 18: Produção de pigmento do isolado FT9.12.....	45
Figura 19: Perfil do cromatograma do isolado FT9.12 exibindo pico a 3,9 minutos (a). Espectro UV de absorção do isolado FT9.12 a 3,9 minutos (b).....	46
Figura 20: Perfil do cromatograma do isolado FT5.10 exibindo pico a 4,0 minutos (a). Espectro UV de absorção do isolado FT5.10 a 4,0 minutos (b).....	46

Figura 21: Mecanismo de ação de sequestro de radicais livres de antioxidantes.....	48
Figura 22: Percentagem de sequestro de radical livre DPPH• dos isolados FT9.12 e FT5.10.....	49
Figura 23: Percentagem de sequestro de radical livre ABTS•+ dos isolados FT 9.12 e FT 5.10.....	51
Figura 24: Perfil do espectro de absorção do extrato do isolado FT9.12.....	52
Figura 25: Perfil do espectro de absorção do extrato do isolado FT5.10.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Carotenoides presentes em bactérias.....	24
Tabela 2: Isolados bacterianos cedidos pelo GDBM do laboratório de biologia molecular da UEPB – Campus V.....	33
Tabela 3: Resultado das provas para identificação bioquímica para os isolados FT 5.10 e FT9.12.....	43
Tabela 4: Dados obtidos na análise por HPLC dos extratos brutos dos isolados FT 5.10 e FT9.12.....	47
Tabela 5: Valores do FPS do extrato metanólico bruto dos isolados FT 5.10 e FT 9.12...	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs.: Absorbância

ABTS: 2,2' – Azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)

BHI: Infusão Coração e Cérebro

DPPH: Radical 2,2-difenil1-picrihidrazil

DMSO: Dimetilsulfóxido

FPS: Fator de Proteção Solar

GDBM: Grupo de diversidade e biotecnologia de microrganismos

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Pressão

LB: Luria Bertani

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

PCR: Reações em Cadeia de Polimerase

rpm: Rotações por minuto

TR: Tempo de retenção

TSB: Caldo Soja Trypticaseína

UEPB: Universidade Estadual da Paraíba

UV: Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

Até meados do século XIX, os corantes eram obtidos de fontes naturais, como extratos de plantas, árvores, líquens ou de insetos. Em 1856, Henry Perkin sintetizou o primeiro corante, a mauvepina. Desde então, um grande número de corantes é produzido e esses são utilizados nas indústrias alimentícias, têxteis, de papel, cerâmica, farmacêuticas e cosméticas. Existem aproximadamente 10.000 tipos de corantes (SAHOO; GUPTA; PAL, 2005).

Atualmente, as plantas são a principal fonte de corantes naturais, porém apresentam algumas desvantagens como dependência de fatores climáticos e amplo espaço físico, variação significativa da coloração de lote para lote (MAPARI *et al.*, 2009) e quantidade disponível na natureza insuficiente para suprir as necessidades industriais atuais (ABEROUMAND, 2011).

Neste contexto, a produção biotecnológica de corantes naturais tem atraído atenção por serem obtidos rapidamente por processos fermentativos, por não estar sujeita a variabilidade sazonal e geográfica e por causa das vantagens econômicas de processos microbianos utilizando substratos naturais de baixo custo para a bioprodução e também por apresentarem atividades biológicas benéficas à saúde, tais como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

Entre os microrganismos existentes as actinobactérias se destacam por serem grandes produtoras de metabólitos secundários possuindo diversas aplicações como fármacos, corantes e fragrâncias (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010). Os pigmentos como os carotenoides apresentam cores que variam entre o amarelo e o vermelho e são abundantes em plantas e microrganismos. Eles possuem atividades antioxidantes e podem prevenir câncer e reduzir o risco de doença cardiovascular e de Alzheimer (HEIDER; PETERS-WENDISCH; WENDISCH, 2012).

Micrococcus luteus é uma bactéria Gram-positiva pertencente a ordem Actinomycetales e produz um carotenoide amarelo, denominado sarcinaxantina que possui 50 carbonos (C₅₀), que apresenta maior quantidade de duplas ligações conjugadas e possui grupos hidroxilas, o que contribui para sua maior capacidade antioxidante (NETZER *et al.*, 2010; MANDELLI *et al.*, 2012). Essa bactéria é ubíqua na natureza e pode ser facilmente encontrada em ambientes naturais, ela pertence a microbiota normal da pele e é capaz de suportar condições de estresse (UMADEVI; KRISHNAVENI, 2013).

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro e abrange uma área de aproximadamente 800.000 km² que representa quase 70% da região nordeste. Apesar da área que ocupa e do uso não sustentável dos seus recursos terrestres, a Caatinga tem sido apontada como um dos biomas brasileiros menos conhecidos e mais negligenciado (SANTOS; ALMEIDA-CORTEZ; FERNANDES, 2011; APGAUA *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Os corantes artificiais são amplamente utilizados em várias indústrias devido a vários fatores como maior estabilidade, maior disponibilidade, maior gama de tonalidade e obtenção mais econômica, entretanto, eles podem apresentar efeitos adversos como reações imunológicas, reações alérgicas e carcinogenicidade (KANAREK, 2011; SHEN *et al.*, 2014), por isso os corantes naturais são cada vez mais utilizados como alternativas aos corantes artificiais (SCOTTER, 2011) pois acredita-se que sejam mais seguros para a saúde e são biodegradáveis. Além disso, apresentam propriedades biológicas benéficas à saúde (CRISTEA; VILAREM, 2006).

Devido à tendência em se evitar o consumo de produtos que contenham corantes artificiais, o mercado de corantes naturais tem se mostrado muito promissor. Os carotenoides vêm recebendo crescente atenção e se estima um valor comercial agregado a estes de aproximadamente 1,2 bilhões de dólares, com crescimento anual de 2,3% no mercado global (HEIDER *et al.*, 2014b).

Micrococcus luteus é um representante das actinobactérias e produz um pigmento carotenoide denominado sarcinaxantina que possui características estruturais diferenciadas (NETZER *et al.*, 2010). Existem poucos estudos sobre este carotenoide para utilização como corante natural e avaliação das suas propriedades biológicas.

A Caatinga é considerado um ambiente extremo pois apresenta características hostis aos seres humanos e a maioria dos microrganismos. Os microrganismos que se desenvolvem em tais ambientes são denominados extremófilos (CANGANELLA; WIEGEL, 2011). Apesar da importância biológica desse ecossistema, são poucos os estudos focados em sua diversidade microbiana (GÖRLACH-LIRA *et al.*, 2007).

Diante do exposto, a proposta deste trabalho foi extrair e caracterizar carotenoides produzidos por bactérias do solo do bioma Caatinga e avaliar suas atividades biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de corantes naturais em bactérias isoladas do Semiárido brasileiro.

3.2 Objetivos específicos

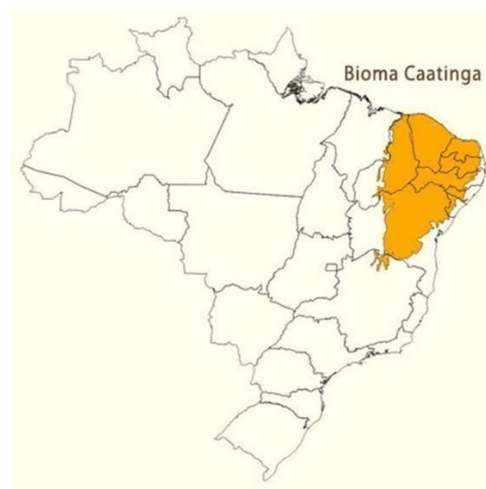
- Realizar a triagem de bactérias produtoras de corantes naturais isoladas do Semiárido e cedidas pelo GDBM do Laboratório de Biologia Molecular da UEPB – CampusV;
- Realizar a extração e caracterização dos carotenoides de *Micrococcus luteus* por técnica cromatográfica;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto *in vitro* de *Micrococcus luteus*;
- Analisar a eficácia fotoprotetora do extrato bruto *in vitro* de *Micrococcus luteus*.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Bioma Caatinga

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro e ocupa uma área de 840.000 km², o que equivale a aproximadamente 10% do território nacional. Abrange os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (Figura 1) (SANTOS; ALMEIDA-CORTEZ; FERNANDES, 2011).

Figura 1: Mapa da localização do Bioma Caatinga.



Fonte: Cerratinga

Disponível em: < <http://www.cerratinga.org.br/caatinga/> > Acesso em ago. 2015.

Este bioma é o quarto maior ecossistema do Brasil. É um bioma heterogêneo constituído predominantemente por uma floresta espinhosa (6-10 m de altura), pequenos arbustos e folhas finas, geralmente dotada de espinhos, como cactos e bromélias e que são em sua maioria formados de folhas decíduas (Figura 2). O termo "Caatinga", significa "mata branca" na língua Tupi. Esta denominação se refere ao aspecto da vegetação durante a estação seca quando a maioria das árvores perde suas folhas e hastes esbranquiçadas dominam a paisagem (SANTOS; ALMEIDA-CORTEZ; FERNANDES, 2011; MOURA *et al.*, 2015).

O bioma Caatinga mostra, como principais características, baixas taxas de precipitação anual (abaixo de 800 mm), altas temperaturas diurnas, baixos níveis de humidade e elevada taxa de incidência de radiação solar. A temperatura ambiente varia entre 23°C e 27°C, enquanto o solo pode alcançar temperaturas de cerca de 60°C (APGAUA *et al.*, 2014; MENEZES *et al.*, 2015).

Figura 2: Vegetação do Bioma Caatinga



Fonte: Moura *et al.* (2015).

O solo sob a vegetação da Caatinga é um habitat bastante peculiar, com características próprias cuja atividade biológica é extremamente rica e ainda pouco explorada. É um ambiente hostil para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos. Ambientes hostis ou extremos, são reconhecidos como ricos habitats com espécies altamente adaptadas (SILVA; MARTINS; MARTINS, 2015; DUARTE *et al.*, 2012).

Os microrganismos que vivem sob condições hostis são denominados extremófilos e sintetizam compostos com promissor potencial biotecnológico. Há grande interesse na aplicação destes compostos na medicina, indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos (MOROZKINA *et al.*, 2010).

Os microrganismos do solo são fortemente influenciados por vários fatores físicos e químicos, incluindo a disponibilidade de nutrientes, matéria orgânica, umidade do solo e temperatura (BLOEM *et al.*, 1992; WARDLE, 1998). Em ambientes áridos ou semiáridos todos esses fatores são geralmente desfavoráveis para o crescimento microbiano no solo.

Os microrganismos que se desenvolvem no solo da Caatinga devem apresentar uma resposta adaptativa que inclui, entre outras, a produção de pigmentos carotenoides para proteger o microrganismo de dano oxidativo. Entre os microrganismos, as actinobactérias constituem um grupo representativo em termos de riqueza e diversidade e são capazes de crescerem em condições extremas (CANGANELLA; WIEGEL, 2011; MANDELLI *et al.*, 2012; SILVA; MARTINS; MARTINS, 2015).

Apesar de ser uma região rica de diversidade de espécies com um alto grau de endemismo de plantas e animais, e de abrigar grande diversidade de microrganismos, ainda há poucos estudos ecológicos neste bioma e menos de 1% da Caatinga é protegido por áreas

de conservação (LEAL *et al.*, 2005).

4.2 Actinobactérias

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas com elevada concentração de guanina e citosina (G + C) no DNA, amplamente distribuídas na natureza, mas o seu habitat principal é o solo. Estes microrganismos produzem compostos terpenoides responsáveis pelo odor característico do solo (VENTURA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2015).

O termo Actinobacteria é derivado do grego “aktis” (traço) e “mykes” (fungo), e designa um grupo de bactérias constituídas de micélios, com organização filamentosa, muitas vezes ramificada denominadas hifas, semelhantes às dos fungos, porém mais estreitas (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Este grupo de bactérias apresenta ampla diversidade morfológica. Alguns microrganismos apresentam forma de cocos (*Micrococcus*), coco-bacilo (*Arthrobacter*), outros em formas de hifas curtas e rudimentares (*Nocardia* spp.) e micélio ramificado (*Streptomyces* spp.) (VENTURA *et al.*, 2007).

As actinobactérias desempenham um papel importante na indústria farmacêutica e médica pela sua capacidade de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas, dentre os quais se destacam os antibióticos. Também produzem diferentes tipos de compostos com atividades antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante (JANARDHAN *et al.*, 2014).

Além disso, as actinobactérias também são importantes para a ecologia do solo, pois participam dos processos de ciclagem de nutrientes, biorremediação e de compostagem, processos decorrentes da degradação enzimática de substratos orgânicos complexos, tóxicos e de resíduos de materiais utilizáveis na agricultura, respectivamente (SILVA *et al.*, 2015).

4.3 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus é um representante das Actinobactérias e pertence ao gênero *Micrococcus*. É uma bactéria aeróbica, Gram-positiva, não formadora de esporos, não apresenta motilidade e tem a forma de cocos (MOHANA, THIPPESWAMY, ABHISHEK, 2013; BRASIL, 2012). Ela foi isolada por Alexander Fleming em 1929 e inicialmente foi denominada como *Micrococcus lysodeikticus*. Ela é capaz de sobreviver sob condições de estresse como extremos de temperatura e pouca quantidade de nutrientes (UMADEVI; KRISHNAVENI, 2013).

As bactérias do gênero *Micrococcus* são ubíquas na natureza e podem ser facilmente encontradas em ambientes naturais. Elas pertencem a microflora normal da pele (WILLEY *et al.*, 2008), podem degradar hidrocarbonetos (ZHUANG, 2003), poluentes orgânicos tóxicos e podem tolerar a presença de metais (SANDRIN; MAYER, 2003).

A bactéria *M. luteus* produz pigmentos carotenoides que apresentam características estruturais muito diferentes daquelas comumente encontrada em alimentos, tais como um maior número de átomos de carbono, de ligações duplas conjugadas e de grupos hidroxila, o que confere uma maior atividade antioxidante (NETZER *et al.*, 2010; ALBRECHT *et al.*, 2000; KLASSEN; FOGHT, 2011).

4.4 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos originados da via biossintética dos terpenoides, cuja coloração varia do amarelo ao vermelho e são encontrados em plantas, animais e microrganismos. Estes compostos têm atraído o interesse das indústrias farmacêuticas, cosmética, de alimentos e rações não só devido a sua coloração, mas também por serem precursores da vitamina A, por suas atividades antioxidantes e possíveis atividades anticancerígenas (KOPEC *et al.*, 2012).

A ingestão de carotenoides como a luteína e zeaxantina, por exemplo, parecem proteger o olho contra degeneração macular; a ingestão da betacriptoxantina, encontrada em altos níveis em citros, pode estar inversamente associada com risco de câncer de pulmão (MANNISTO *et al.*, 2004) e o consumo de produtos ricos em licopeno tem sido associado à proteção contra certos tipos de câncer, principalmente o de próstata (GIOVANNUCCI *et al.*, 1995).

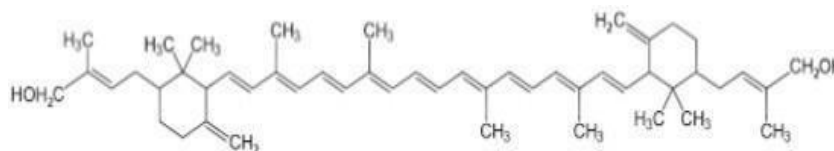
Os carotenoides são classificados em carotenos e xantofilas. Os carotenos são compostos somente por átomos de carbono e hidrogênio, como o beta-caroteno e o licopeno. As xantofilas, por sua vez, são derivados oxigenados dos carotenos como a zeaxantina, a cantaxantina, a espiriloxantina, a torularodina e a violaxantina (RIVERA; CANELA-GARAYOA, 2012; MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

Os carotenos são apolares e as xantofilas são mais polares, mas ainda insolúveis em água. Por isso, os carotenos são solúveis em solventes apolares como éter de petróleo, hexano, tolueno, enquanto as xantofilas são melhor solubilizadas em solventes polares como o metanol e etanol (RODRIGUES-AMAYA, 1999).

A grande maioria dos carotenoides possui 40 carbonos e são encontrados nos alimentos e uma pequena quantidade de carotenoides possui 50 carbonos (C50) e são

produzidos por um número restrito de bactérias. Os carotenoides C50 são sintetizados por bactérias da ordem Actinomycetales (NETZER *et al.*, 2010) e por bactérias Gram-negativas *Pseudomonas* (MIKI *et al.*, 1994). Entre os carotenoides C50 conhecidos atualmente encontra-se a sarcinaxantina (Figura 3) que é produzida por *Micrococcus luteus* (NETZER *et al.*, 2010).

Figura 3: Estrutura química da sarcinaxantina.



Fonte: NETZER *et al.* (2010).

Os carotenoides sintetizados por microrganismos têm a função de proteger as células contra as ações letais de radiação ionizante, radiação UV e de peróxido de hidrogênio. Ou seja, eles podem desempenhar um papel tanto na estabilização da membrana como também na proteção contra agentes oxidantes, e por isso estes compostos são essenciais para a sobrevivência dos microrganismos principalmente quando se localizam em ambientes hostis. Na tabela 1 pode-se observar tipos de carotenoides produzidos por microrganismos (MANDELI *et al.*, 2012).

A capacidade antioxidante dos carotenoides é atribuída à sua estrutura. Eles possuem um sistema de duplas ligações conjugadas, e quando a energia de excitação é transferida para o carotenoide, ela é dissipada na forma de calor e a molécula retorna para o estado fundamental inicial. Assim, um ciclo catalítico é gerado, de modo que o carotenoide pode ser submetido a outro ciclo de eliminação de oxigênio singlete (STAHL; SIES, 2012). Os C50 apresentam múltiplas duplas ligações conjugadas e eles contêm pelo menos um grupo hidroxila, essas características contribuem fortemente com suas propriedades antioxidantes (NETZER *et al.*, 2010).

Tabela 1: Carotenoides presentes em bactérias.

Bactérias	Carotenoides
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	licopeno e xantofila
<i>Flavobacterium</i>	zeaxantina
<i>Mycobacterium phlei</i>	xantofilas
<i>Deinococcus radiophilus</i>	derivados de 4-ceto- γ -caroteno
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	derivados de 4-ceto- γ -caroteno
<i>Chlorobium</i>	clorobacteno, β -isorenierateno, isorenierateno
<i>Brevibacterium KY-4313</i>	cantaxantina
<i>Brevibacterium 103</i>	astaxantina
<i>Mycobacterium lacticola</i>	astaxantina
<i>Rhodococcus maris</i>	cantaxantina
<i>Mycobacterium brevicale 32-MCT</i>	cantaxantina
<i>Pseudomonas extorquens</i>	rodoxantina
<i>Chloroflexus</i>	β -caroteno, γ -caroteno
<i>Herpetosiphon</i>	mixobacteno
<i>Synechococcus</i>	β -caroteno, equinenona, zeaxantina, caloxantina
<i>Micrococcus</i>	sarcinaxantina
<i>Bacillus</i>	β -caroteno, C50 carotenoides
<i>Staphylococcus</i>	C30 carotenoides, β -caroteno,
<i>Sarcina</i>	licopeno, zeaxantina, β -caroteno, C50 carotenoides
<i>Enterococcus</i>	C30 carotenoides

Fonte: Adaptado de Johnson e Schroeder (1996).

4.4.1 Via biossintética dos carotenoides

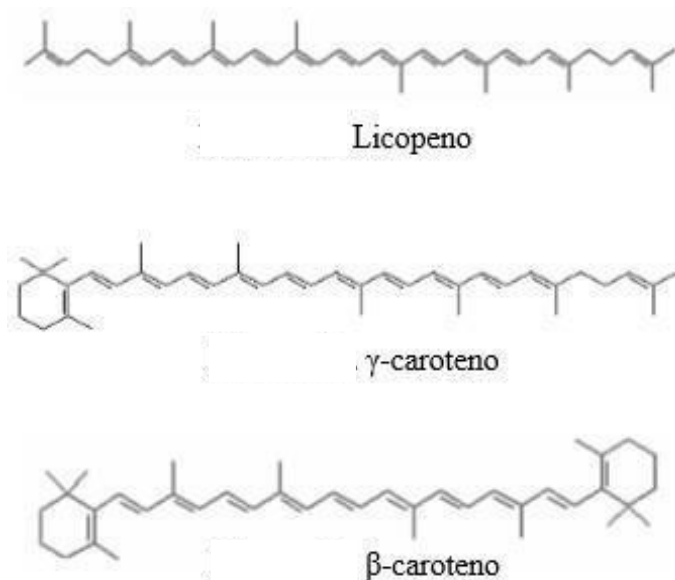
Os terpenoides são formados a partir de unidades básicas de 5 carbonos: isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilail difosfato (DMAPP) (KISER; GOLCZAK; PALCZEWSKI, 2014). As unidades básicas precursoras dos terpenoides podem ser produzidas por duas vias: A via do ácido mevalônico (MVA) e a via metileritritol fosfato (MEP) (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN; BORONAT, 2015).

Na via biossintética do MVA, o acetil-coenzima A (acetil-CoA) é convertido a IPP que é posteriormente isomerizado a DMAPP. Na via biossintética do MEP, o IPP é

sintetizado a partir do piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (HEIDER *et al.*, 2014a; MARTIN *et al.*, 2003). A partir dos compostos IPP e DMAPP ocorre reações em cadeia de elongação produzindo os seguintes precursores de carotenoides: farnesil pirofosfato (FPP) com 15 carbonos e geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) com 20 carbonos (HEIDER *et al.*, 2014a). Duas moléculas C20 (GGPP) se unem para formar o fitoeno. O fitoeno é um tetraterpenoide C40 sem cor e sofre uma série de reações de desaturação e isomerização que produz o all- trans-licopeno, que é o precursor do β -caroteno (KISER; GOLCZAK; PALCZEWSKI, 2014).

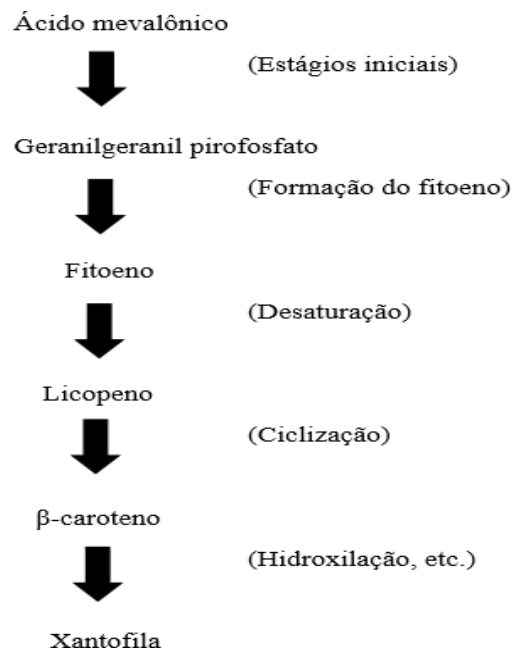
As estruturas conhecidas dos carotenoides são variações das cadeias do licopeno, do γ -caroteno e do β -caroteno (Figura 4). A origem das diferentes estruturas ocorre devido às modificações nestes esqueletos carbônicos por reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, oxidação, isomerização, migração da dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, introdução de funções oxigenadas e/ou a combinação destas, contanto que os grupos metílicos centrais sejam mantidos (Figura 5) (RODRIGUES-AMAYA, 1999). Os carotenoides C50 têm como precursor o Licopeno (NETZER *et al.*, 2010).

Figura 4: Estruturas químicas do licopeno, do γ -caroteno e do β -caroteno.



Fonte: VALDUGA *et al.* (2009)

Figura 5: Fluxograma dos estágios da biossíntese de carotenoides.



Fonte: VALDUGA *et al.* (2009).

4.5 Antioxidantes

4.5.1 Radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados que são altamente instáveis e reativos. Eles são derivados do oxigênio e nitrogênio e originam respectivamente espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

As espécies reativas são produzidas pelos organismos vivos como resultado do metabolismo celular normal e fatores ambientais como a poluição atmosférica ou fumaça de cigarro. Elas podem danificar estruturas das células tais como carboidratos, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas e alterar as suas funções (BIRBEN *et al.*, 2012).

Os EROs incluem radicais livres, tais como, o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), óxido nítrico (NO) e outras espécies como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). Os ERNs são derivados do óxido nítrico através da reação com o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para

formar peroxinitrito (ONOO-) (SEIFRIED *et al.*, 2007; LÜ *et al.*, 2010; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

O estresse oxidativo é caracterizado pela inabilidade dos antioxidantes endógenos de neutralizar o dano oxidativo em alvos biológicos e está associado com patologias severas como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer. Também está relacionado ao envelhecimento (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Os carotenoides apresentam a capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância, atuando dessa forma, como um composto capaz de inibir a oxidação de biomoléculas e protegendo os sistemas biológicos contra o dano oxidativo (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

4.5.2 Atividade antioxidante

O antioxidante é uma substância capaz de prevenir ou retardar a oxidação de outras moléculas (FLORA, 2009). Eles podem diminuir o dano oxidativo diretamente através da reação com radicais livres ou indiretamente através da inibição da atividade ou expressão de enzimas geradoras de radicais livres ou intensificar a atividade ou a expressão de enzimas antioxidantes intracelulares. Enzimas antioxidantes intracelulares e ingestão de antioxidantes na dieta podem ajudar a manter uma adequada capacidade antioxidante no organismo (LÜ *et al.*, 2010).

Os antioxidantes naturais podem ser divididos em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Os antioxidantes não enzimáticos incluem a glutathione, tióis, algumas vitaminas e metais, carotenóides, isoflavonas, polifenóis e flavonoides (SEIFRIED *et al.*, 2007).

Os antioxidantes enzimáticos, por sua vez, são divididos em defesa enzimática primária e secundária. A defesa primária é formada por três importantes enzimas que evitam a formação ou neutralizam os radicais livres: catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

A enzima catalase promove a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (FLORA, 2009). A enzima glutathione peroxidase doa dois elétrons para reduzir os peróxidos e a enzima superóxido dismutase converte ânions superóxidos em peróxido de hidrogênio como substrato para a catalase (CAROCHO; FERREIRA, 2013). As propriedades antioxidantes destas três enzimas permitem eliminar os peróxidos que são substratos potenciais para a reação de Fenton (FLORA, 2009).

A defesa enzimática secundária inclui glutathione redutase e glicose 6-fosfato desidrogenase. A enzima glutathione redutase reduz a glutathione (antioxidante) a partir da sua forma oxidada para sua forma reduzida, reciclando-a, assim, para continuar a neutralizar mais radicais livres. Já a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase regenera o NADPH (coenzima usada em reações anabólicas). Estas duas enzimas não neutralizam radicais livres diretamente mais têm papéis secundários para os outros antioxidantes endógenos (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

4.5.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Os métodos DPPH e ABTS possuem o mesmo mecanismo de ação e se baseiam no sequestro de radicais livres estáveis. O DPPH• e o ABTS•⁺ são radicais livres estáveis e coloridos. O DPPH• apresenta bandas de absorção a 517 nm enquanto o ABTS•⁺ a 734 nm. O decréscimo na intensidade da absorção na presença do antioxidante é registrado após um período de incubação de 25 minutos para o método do DPPH• e 6 minutos para o ABTS•⁺ (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

O radical estável DPPH• sofre redução pelos antioxidantes com mudança de coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora da amostra (Figura 6) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). O radical estável DPPH• está disponível comercialmente enquanto o ABTS•⁺ deve ser gerado a partir da oxidação do ABTS por oxidantes como persulfato de potássio (K₂S₂O₈), dióxido de manganês (MnO₂) ou radicais peroxil (Figura 7) (HENRIQUEZ; ALIAGA; LISSI, 2002).

Estes métodos fundamentam-se na transferência de um átomo de hidrogênio ou transferência de um elétron seguido por uma transferência de próton do antioxidante para os radicais livres (NIKI, 2010).

Figura 6: Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.

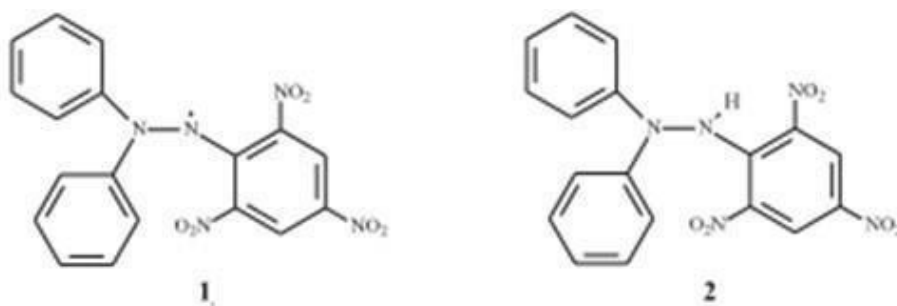
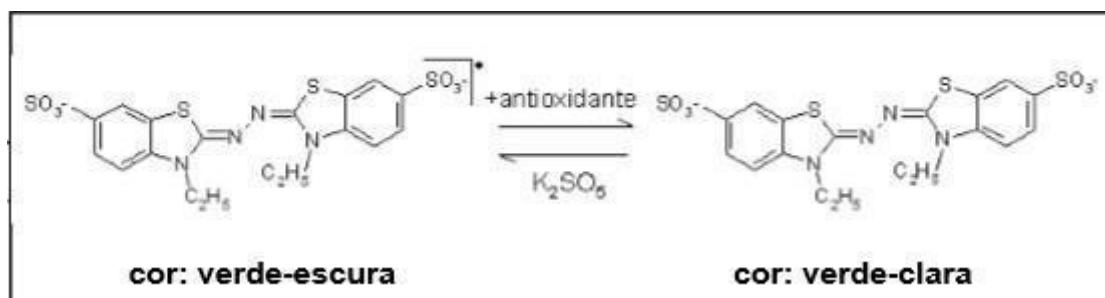


Figura 7: Estabilização do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: Rufino *et al.* (2007).

4.6 Proteção solar

4.6.1 Radiação solar e ultravioleta

A luz solar é composta por espectro contínuo de radiação eletromagnética e pode ser dividida em três diferentes grupos, de acordo com o intervalo de comprimento de onda (λ): radiação ultravioleta, (UV) que compreende os comprimentos de onda que se encontram entre a faixa de 200 a 400 nm, radiação visível, localizada entre a faixa de 400 a 780 nm e infravermelho, no qual os comprimentos de onda se encontram acima de 780 nm. Os raios solares são constituídos por 56% de infravermelho, 39% de luz visível e 5% de radiação ultravioleta (POLEFKA *et al.*, 2012).

A radiação ultravioleta (RUV) pode ser subdividida em UVC (200–290 nm); UVB (290–320 nm) e UVA (320–400 nm). A radiação UVA, por sua vez, é classificada em UVA1 (340-400 nm) e UVA2 (320-340 nm). A radiação UVC é, em grande parte, absorvida pela camada de ozônio, entretanto, as radiações UVA e UVB atingem a superfície terrestre e podem causar danos a pele. A radiação solar ultravioleta na superfície da terra é aproximadamente 90- 99% UVA e 1-10% UVB (BALOGH *et al.*, 2011).

4.6.2 Efeitos da radiação ultravioleta

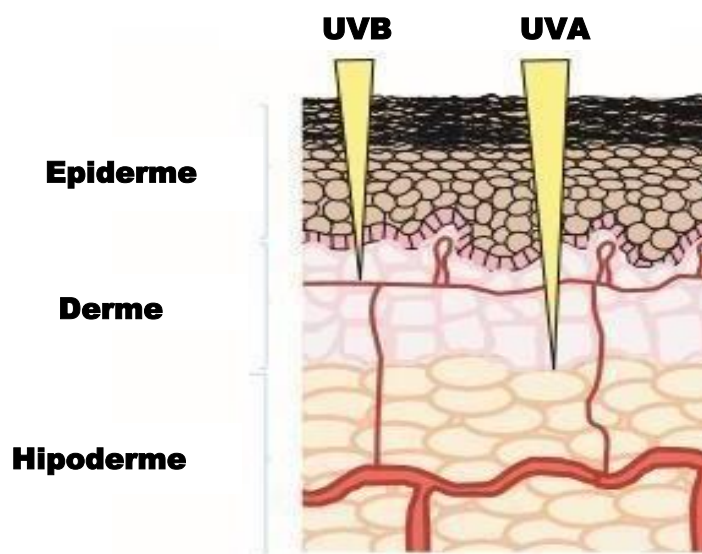
A Radiação UV tem um papel importante na saúde humana, ela é vital para a produção de vitamina D₃, entretanto é um potente carcinogênico responsável por grande parte do câncer de pele na população humana (BINIEK *et al.*, 2012).

A radiação UVC é o tipo mais perigoso de radiação UV, entretanto ela não atinge a terra com grande intensidade pois grande parte fica retida na camada de ozônio. As

radiações UVA e UVB, entretanto, podem causar danos aos seres vivos e seu principal alvo é o DNA e, por conseguinte, tem efeitos cumulativos. Cada uma dessas radiações pode causar danos de tipos distintos (HALIDAY; CADET, 2012).

A radiação UVA penetra nas camadas mais profundas da pele provocando fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento. A radiação UVB atinge as camadas mais superficiais da pele (Figura 8), produzindo dano ao DNA e queimaduras ou eritemas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Figura 8: Penetração dos raios UVA e UVB na pele humana.



Fonte: Adaptado de Polefka *et al.* (2012).

4.6.3 Fotoproteção

A fim de reduzir os efeitos danosos da radiação UV podem ser tomadas diferentes ações fotoprotetoras como evitar a exposição ao sol nos horários de maior intensidade, vestindo roupas de proteção e utilização tópica de protetores solares (JARZYCKA *et al.*, 2013).

Os protetores solares são preparações cosméticas que possuem formas de apresentação diversas. Podem ser encontrados na forma de loções hidroalcoólicas, óleos, géis oleosos, emulsões óleo em água (O/A), emulsões água em óleo (A/O), bastões e aerossóis, entre outras (BALOGH *et al.*, 2011).

O princípio ativo dos protetores solares, os filtros solares, não devem ser irritantes ou sensibilizantes. Eles devem recobrir e proteger a superfície da pele, e não devem ser tóxicos, já que são absorvidos traços deste através da pele ou ingeridos após a aplicação nos lábios. Finalmente, um bom protetor solar deve ser resistente à água, insípido, inodoro e incolor, e

deve ser compatível com formulações cosméticas. Os filtros solares são classificados em orgânicos e inorgânicos (ARAUJO; SOUZA, 2008).

Os filtros solares inorgânicos refletem a radiação incidente e absorve parte das radiações que atinge a pele. Eles formam uma barreira opaca, formada pelo filme de partículas sobre a pele. Dependendo do tamanho da partícula, a proteção pode ocorrer não apenas por meio da reflexão como também da absorção (BALOGH *et al.*, 2011).

Os filtros orgânicos são compostos aromáticos conjugados com grupos carboxílicos. Eles absorvem a radiação UV e a transforma em radiações energéticas inócuas ao ser humano. Este mecanismo torna os filtros orgânicos susceptíveis a fotodegradação e capazes de gerar radicais livres. Uma estratégia para superar esse problema é a combinação de filtros orgânicos com ingredientes bioativos que possuam propriedades fotoprotetora e antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Além de proteger os filtros orgânicos da fotodegradação, a adição de ingredientes bioativos reduz a quantidade de filtros químicos utilizados na formulação de um protetor solar aumentando a sua segurança e diminuindo o impacto ambiental (VELASCO *et al.*, 2008).

4.6.4 Fator de Proteção Solar (FPS)

A eficácia dos fotoprotetores pode ser determinada por metodologias *in vitro* e *in vivo*. Vários parâmetros devem ser avaliados para determinar a eficácia de uma formulação fotoprotetora. O valor do FPS está relacionado à proteção proporcionada frente à radiação UVB (VELASCO *et al.*, 2011).

O Fator de Proteção Solar (FPS) é definido como sendo a dose mínima eritematosa na pele protegida dividida pela dose mínima eritematosa na pele não protegida. A Dose Mínima Eritematosa (DEM) consiste na dose mínima de radiação ultravioleta requerida para produzir a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta (BRASIL, 2002). Para a determinação de FPS utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{FPS} = \frac{\text{DEM na pele protegida}}{\text{DEM na pele não protegida}}$$

A determinação do FPS *in vitro* pode ser realizada por meio da leitura espectrofotométrica de suas soluções diluídas e posterior tratamento matemático por meio da

determinação da transmitância ou da absorbância (também reconhecida como Método de Mansur) (VELASCO *et al.*, 2011).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi extrair e caracterizar carotenoides, avaliar as atividades antioxidante e fotoprotetora de extratos brutos de *Micrococcus luteus* isolados da região do Bioma Caatinga no Nordeste brasileiro.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Triagem das bactérias produtoras de corantes naturais isoladas do Semiárido

Foram cedidos 20 (vinte) isolados bacterianos (Tabela 2) apresentando coloração amarela, laranja e vermelha em meio de cultura sólido (TSB ágar) em placa de *petri* pelo GDBM do laboratório de biologia molecular da UEPB – Campus V.

As bactérias receberam códigos de acordo com a região que foram coletadas: FT para as bactérias que foram coletadas na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Fazenda Tamanduá situada no município de Santa Terezinha - PB, na Mesoregião do Sertão paraibano; e SJC ou SIC para as bactérias que foram coletadas na Área de Proteção Ambiental (APA) do Cariri que abrange os municípios de Cabaceiras, Boa Vista e São João do Cariri – PB.

A triagem das bactérias foi realizada inicialmente de forma visual, nesta etapa dois isolados amarelos, FT5.10 e FT9.12, foram selecionados para estudos posteriores devido a característica fenotípica que indica produção de pigmento. O isolado FT9.12 apresentava um amarelo mais intenso e o isolado FT5.10 um amarelo mais claro. Em seguida foi realizada a identificação molecular do gene 16S rDNA por PCR dos 20 isolados.

Tabela 2: Isolados bacterianos cedidos pelo GDBM do laboratório de biologia molecular da UEPB – Campus V

Códigos	Cor	Códigos	Cor
FT5.28	Amarela	SJC6.11	Laranja
FT9.26	Amarela	FT7.16	Amarela
FT9.16	Amarela	FT5.12	Amarela
FT9.13	Amarela	FT9.15	Amarela
FT9.7	Amarela	FT9.9	Amarela
FT1.13	Amarela	FT9.11	Amarela
SIC5.14	Vermelha	FT9.8	Amarela
FT9.12	Amarela	FT7.22	Amarela
FT9.14	Amarela	FT1.18	Amarela
FT5.10	Amarela	FT1.20	Amarela

5.1.1 Identificação molecular

5.1.1.1 Extração de DNA cromossomal (genômico)

Para a extração de DNA cromossomal (genômico), as células de bactérias foram

cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura LB a 37°C por 48 horas e utilizadas para extração de DNA total segundo metodologia descrita por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

5.1.1.2 Amplificação do gene 16S rDNA por PCR

O gene do DNA ribossomal 16S (16S rDNA) foi amplificado por PCR utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG *et al.*, 1991).

A amplificação das amostras foi efetuada em volume final de 25 µL contendo tampão 10X, dNTPs (10mM.), MgCl₂ (50mM.) e Taq polimerase (2,5 U/µL), iniciadores (50pmol/cada) e 1 µL da amostra de DNA. As reações foram realizadas em termociclador (C1000 Thermal Cycler – BioRad), programado com um ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos, cada ciclo consistindo de uma etapa de desnaturação (95°C por 45 segundos), uma etapa de anelamento (60,6°C por 45 segundos) e uma etapa de extensão (72°C por 2 minutos) e, por fim, uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Após o processo de amplificação, cada reação foi avaliada por eletroforese. Para isso, foram adicionados às reações: 7 µL de tampão de amostra e 3 µL de SYBER Green. Essa mistura foi aplicada em gel de agarose a 1,2%, em tampão de corrida TBE 0,5x, utilizando como marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Em seguida, o gel foi observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

5.1.1.3 Purificação e sequenciamento do DNA

Os produtos da PCR foram purificados com o kit de purificação PureLink (Invitrogen) e o sequenciamento realizado em sequenciador automático de DNA ABI 3500.

5.1.1.4 Alinhamento múltiplo das sequências de *Micrococcus luteus*

O alinhamento múltiplo das sequências de *Micrococcus luteus* foi realizado a partir do programa CLUSTALw (THOMPSON *et al.*, 1994) e visualizado através do programa MEGA 6.0.

5.1.1.5 REP-PCR

A reação de amplificação de elementos repetitivos do DNA bacteriano com o

“primer” (GTG)₅ foi realizada seguindo a metodologia utilizada por Lucena *et. al.*, 2010, em volume final de 25 µl contendo 0,2 pmol de cada iniciador, 0,2 mM de cada dntp, tampão de reação (1X) com 3 mM MgCl₂, 0,025 µg/µl BSA e 1U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi programada para 1 ciclo de desnaturação de 7 minutos à 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, anelamento à 40°C por 1 minuto, extensão à 65°C por 8 minutos, e extensão final à 65°C por 16 minutos (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% submetidos a 5h/100V em tampão TBE 0,5X, corados em SIBER, visualizados em transiluminador ultravioleta.

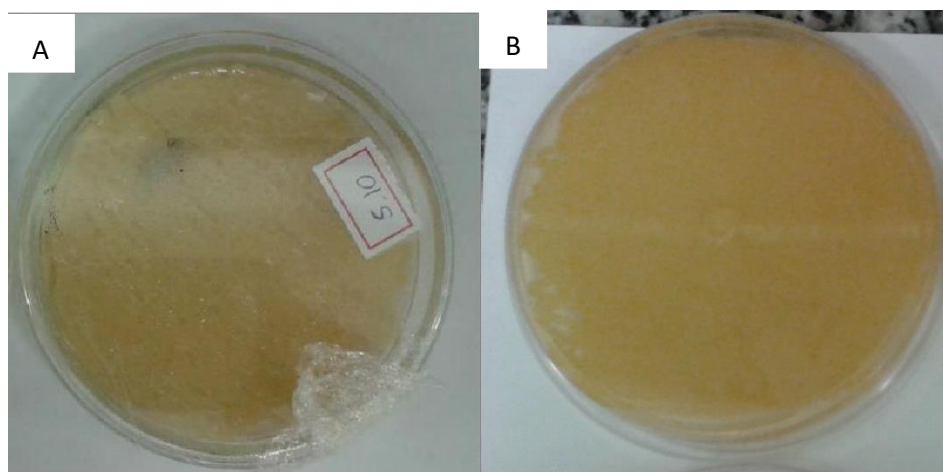
5.1.1.6 Análises dos dados

As sequências resultantes foram analisadas usando as ferramentas Pregap4 e Gap4 do pacote de softwares STADEN 1.6 e submetidas à busca de similaridade no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), utilizando a ferramenta Blast N (ALTSCHUL *et al.*, 1997), e Ribosomal Database Project (RDP). A identificação bacteriana foi assumida quando a sequência de consulta mostrou similaridade > 97% para o gene 16S (GEVERS *et al.*, 2005).

5.2 Manutenção dos microrganismos

A manutenção dos isolados FT5.10 e FT9.12 foi feita por repiques regulares em meio TSB em placas de *petri* e mantidos refrigerados a 4°C (Figura 9).

Figura 9: Cultura dos isolados FT5.10 (a) e FT9.12 (b) em meio TSB ágar.



5.3 Provas de identificação bioquímica

A caracterização fenotípica dos isolados FT5.10 e FT9.12 foi realizada através de testes bioquímicos como a coloração de Gram, prova da catalase, teste do crescimento em ágar manitol salgado, teste da bacitracina e prova da hidrólise da bileesculina.

5.4 Cinética de crescimento *versus* produção de pigmento

5.4.1 Preparação do pré-inoculo

Foi transferida assepticamente, com o auxílio de uma alça bacteriológica, uma amostra do isolado estocado em placa de *petri* para um erlenmeyer de 250mL, contendo 100mL de meio TSB previamente esterelizado. Em seguida ficou incubado a 30°C e 180 rpm por 24 horas em incubadora com agitação orbital.

5.4.2 Cinética de crescimento

Para determinar a cinética de crescimento para os dois isolados bacterianos foi realizada uma fermentação submersa em meio TSB (Figura 10). Inicialmente, 100 mL do meio de cultura foi acondicionado em erlenmeyers de 250 mL e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Em seguida, foi transferido do pré-inoculo para erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio TSB, com o auxílio de uma pipetadora automática, volume necessário para a obtenção de uma densidade optica de 0,1 no tempo inicial no comprimento de onda de 600 nm.

A fermentação submersa foi iniciada e alíquotas de 1mL da cultura foram retirados em intervalos de tempos determinados (0, 2, 4, 6, 24, 26, 48, 50 e 72h) para quantificar espectrofotometricamente o crescimento da biomassa. A fermentação foi realizada a 30°C, 180 rpm por 72 horas (ASKER; OHTA, 1999), todo experimento foi realizado em triplicata.

Figura 10: Fermentação submersa de isolado bacteriano.



5.4.3 Produção de pigmento

Para a determinação da produção do pigmento alíquotas de 1mL foram coletados nos tempos 0, 6, 24, 48 e 72 horas, armazenados em microtubos, centrifugados em uma microcentrífuga a 10.000 rpm por 5 minutos e a biomassa obtida foi liofilizada. Para a extração do pigmento foi adicionado ao microtubo 1mL do solvente (álcool metílico) e a biomassa e o solvente foram homogeneizadas com auxílio do vórtex durante 30 segundos, em seguida a mistura biomassa-solvente permaneceu durante dois minutos no banho ultrassônico.

A mistura biomassa-solvente foi centrifugada por 5 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para uma cubeta de quartzo e a produção de pigmento foi quantificada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 450 nm (ARULSELVI *et al.*, 2014). Todo experimento foi realizado em triplicata.

5.5 Obtenção do extrato bruto

A obtenção do extrato bruto dos dois isolados bacterianos foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Netzer e colaboradores (2010) e em Kaiser e colaboradores (2007). Para isto foi realizado uma fermentação submersa em 6 litros de meio TSB a 30°C, a 180 rpm por 48h. Em seguida o meio de cultura foi centrifugado em falcons de 50 mL em uma macrocentrífuga por 14.000 rpm durante 6 minutos e o pellet obtido foi lavado com água esterilizada. Após liofilização o pellet foi pesado (6,0g) e tratado com lisozima (1mL), em seguida foi adicionado álcool metílico e a mistura biomassa-solvente foi homogeneizada no vórtex por 1 minuto e permaneceu no banho ultrassônico por 30 minutos. Vários ciclos de extração foram realizados até não se observar mais coloração no solvente de extração.

Em seguida, o extrato obtido foi seco em rotaevaporador a 40°C e foi submetido a saponificação. O material residual foi ressuspendido em diclorometano e KOH metanólico 30% (1:1) e permaneceu sob agitação no escuro por 1 hora. Foi adicionado 5 mL de solução salina a 5% e o material foi centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm. A fase não colorida formada foi descartada. A lavagem com solução salina a 5% foi repetida até o pH ficar neutro. O extrato foi novamente seco em rotaevaporador e o material residual foi ressuspendido em 10 mL de álcool metílico (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2007).

O extrato obtido foi analisado em HPLC para caracterização dos pigmentos carotenoides e foi utilizado para análise da capacidade antioxidante e determinação da eficácia fotoprotetora.

5.6 Caracterização dos pigmentos carotenoides por HPLC

Os carotenoides foram analisados com cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), utilizando a coluna SunFire C18 (4.6 x 150 mm), a fase móvel utilizada foi acetonitrila/metanol/acetato de etila (10:50:40%) e o comprimento de onda de 450 nm. O beta- caroteno foi utilizado como padrão externo.

5.7 Atividades antioxidantes

5.7.1 Método DPPH

A avaliação da capacidade em sequestrar o radical livre DPPH• foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Blois (1958). Numa microplaca de 96 poços, 40 µL dos extratos metanólicos na concentração de 1000 µg/mL, reagiram com 250 µL de solução metanólica de DPPH• durante 25 minutos, ao abrigo da luz. A medida da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 517 nm em leitor de Microplacas. Todas as análises foram feitas em triplicata. O ácido gálico foi utilizado como padrão. A percentagem de sequestro de radical livre (%SRL) foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{SRL (\%)} = \frac{(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra})}{\text{Abs. controle}} \times 100$$

5.7.2 Método ABTS

Este método foi realizado segundo Re e colaboradores (1999). O radical ABTS•⁺ foi preparado a partir da reação de 7,81 mL da solução de ABTS com 0,137 mL da solução de persulfato de potássio. A mistura permaneceu no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, 1 mL desta mistura foi diluída em álcool etílico até obter uma absorbância de 0,700 (±0,020) nm a 734 nm. Foram adicionadas 10 µL das amostras dos dois extratos metanólicos brutos dos isolados FT9.12 e FT5.10 na concentração 1000 µg/mL em 1 mL do reagente de ABTS e a absorbância das amostras foi determinada exatamente após 6 minutos no comprimento de onda de 734 nm. O BHT foi utilizado como padrão. Todas as análises foram feitas em triplicata. A percentagem foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{SRL (\%)} = \frac{(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra})}{\text{Abs. Controle}} \times 100$$

5.8 Determinação do Fator de proteção Solar (FPS)

Soluções metanólicas de concentração 100 mg/L foram preparadas em triplicata com o extrato bruto dos isolados FT5.10 e FT9.12 e a absorbância determinada em espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda: 290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320 nm. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do FPS utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{FPS} = \text{FC} \cdot \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot \text{I}(\lambda) \cdot \text{Abs}(\lambda)$$

Onde: FC = fator de correção; EE (λ) = efeito eritematígeno da radiação solar em cada comprimento de onda (λ); I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda (λ); Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da formulação em solução no comprimento de onda (λ).

5.9 Análises estatísticas

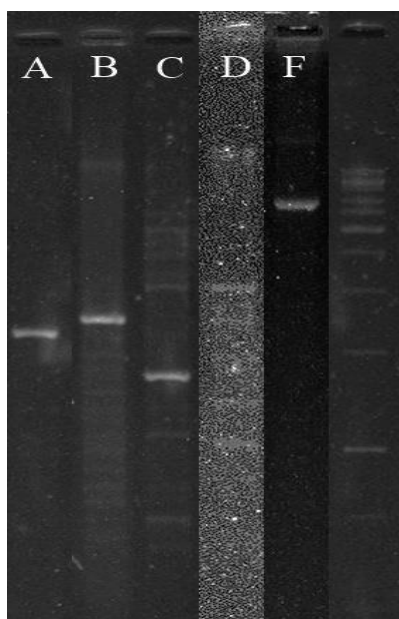
Os dados dos experimentos foram representados por média ($\pm$ SD) e analisados com o programa GraphPad Prism 5. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$.

Portanto, fez-se necessário a utilização de outro marcador genético que refletisse a variabilidade genética entre os isolados de *M. luteus*. O rep-PCR tem demonstrado ser uma ferramenta valiosa para identificar, rastrear e analisar a diversidade bacteriana, visto que 5% do genoma bacteriano é constituído por sequências de DNA repetitivos, e sendo assim a PCR, utilizando esse DNA repetitivo como iniciador, tem gerado perfis de amplificação únicos, refletindo uma impressão digital única para as linhagens bacterianas, uma vez que cada linhagem ou isolado bacteriano possuem sequências repetitivas localizadas em regiões distintas de seu genoma (ISHII; SADOWSKY, 2009).

Desta forma, a técnica rep-PCR com o primer GTG5 foi utilizada com o objetivo de diferenciar a nível intra-específico estes isolados. Os isolados de *Micrococcus luteus* apresentaram seis perfis de amplificações distintos.

Os isolados FT9.7, FT9.9, FT9.12 apresentaram o perfil A; os isolados FT9.11, FT9.14 e FT9.15 apresentaram o perfil B; e os isolados FT9.16, FT 9.26, FT5.10 e FT5.28 apresentaram os perfis C, D, E, F, respectivamente. (Figura 12). Sabendo que cada perfil de amplificação pode estar associado a uma “impressão digital” de uma linhagem distinta, esses dados indicam para a ocorrência de linhagens diferentes de *Micrococcus luteus* entre os isolados, o que pode corroborar com os dados fenotípicos, quanto a diferenças na intensidade de pigmentação apresentada.

Figura 12: Perfis genéticos das linhagens de *Micrococcus luteus*.



6.2 Provas para identificação bioquímica

Os dois isolados de *M. luteus* selecionados (FT9.12 e FT5.10) foram submetidos a coloração de Gram, que é uma técnica utilizada para classificar bactérias com base na morfologia celular e comportamento diante dos corantes. Os isolados FT9.12 e FT5.10 foram identificados como bactérias Gram-positivas e apresentaram forma de cocos com arranjos em cachos.

O resultado da prova da catalase foi positiva para os isolados FT 5.10 e FT 9.12. Os dois isolados apresentaram sensibilidade à bacitracina (disco taxa A de 0,04 unidade) e foi possível observar um halo ao redor das colônias (Figura 13).

Os resultados para o teste de crescimento em ágar manitol salgado e teste da hidrólise da esculina (Figura 14) foram negativos para os dois isolados bacterianos o que é característico para *Micrococcus* (BRASIL, 2013). O resultado das provas para identificação bioquímica estão apresentadas na tabela 3.

Figura 13: Teste da bacitracina.

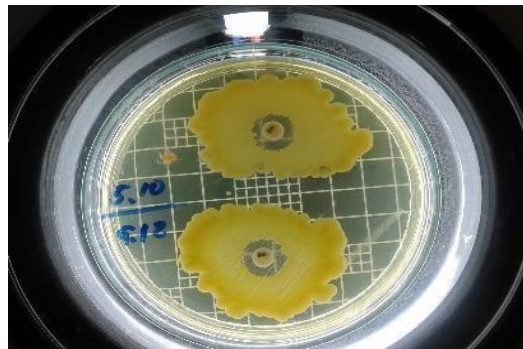


Figura 14: Teste da hidrólise da esculina.



Tabela 3: Resultado das provas para identificação bioquímica para os isolados FT5.10 e FT9.12.

Provas Bioquímicas	FT 5.10	FT 9.12
Coloração de Gram	Positivo	Positivo
Morfologia	Cocos com arranjos em cachos	Cocos com arranjos em cachos
Catalase	Positivo	Positivo
Sensibilidade à bacitracina	Positivo	Positivo
Crescimento em ágar manitol salgado	Negativo	Negativo
Teste da hidrolise da esculina	Negativo	Negativo
Motilidade	Negativo	Negativo
Coloração	Amarela	Amarela

6.3 Cinética de crescimento *versus* produção de pigmento

Para determinar a cinética de crescimento, os isolados FT5.10 e FT9.12 foram submetidos a fermentação submersa a 30°C, a 180 rpm por 72h. Alíquotas de 1mL foram retiradas em triplicata no tempo 0, 2, 4, 6, 24, 26, 48, 50 e 72h e o crescimento da biomassa foi quantificado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 600 nm. Abaixo estão os gráficos da cinética de crescimento (Figuras 15 e 16):

Figura 15: Cinética de crescimento do isolado FT5.10.

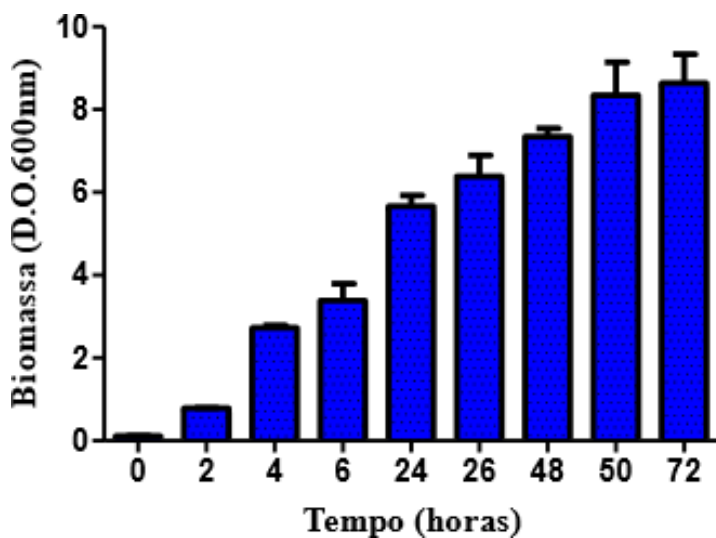
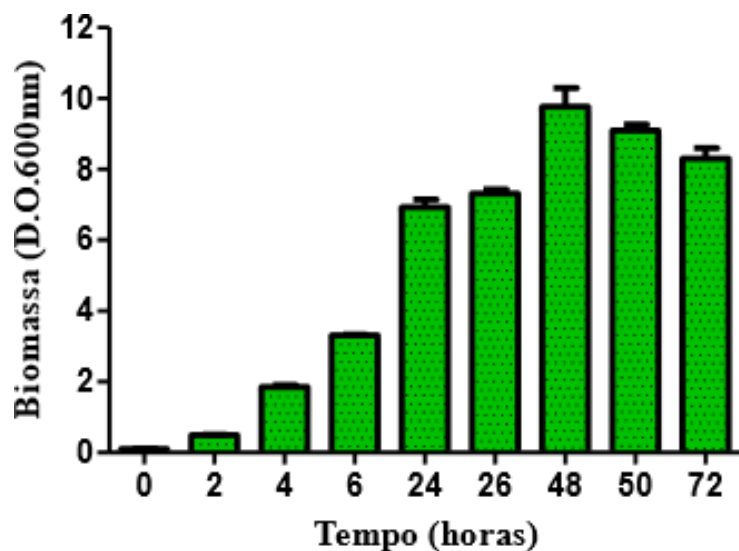


Figura 16: Cinética de crescimento do isolado FT9.12.



Concomitantemente, a produção de pigmento foi monitorada retirando-se alíquotas de 1mL nos tempos 0, 6, 24, 48 e 72h e quantificando espectrofotometricamente no comprimento de onda de 450 nm (Figura 17 e 18).

Figura 17: Produção de pigmento do isolado FT5.10.

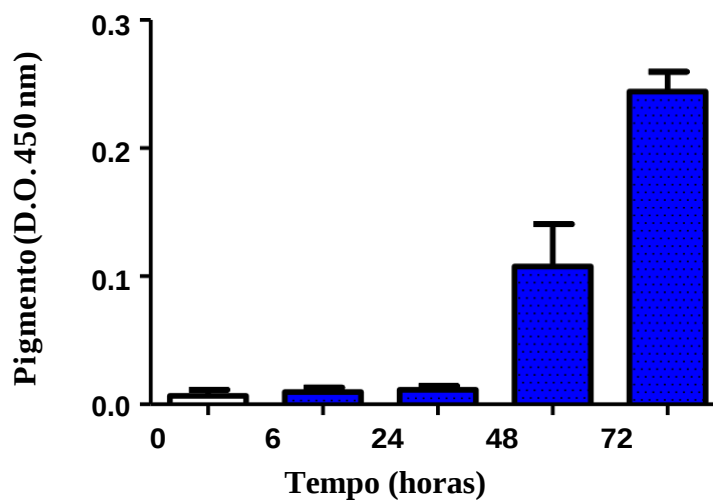
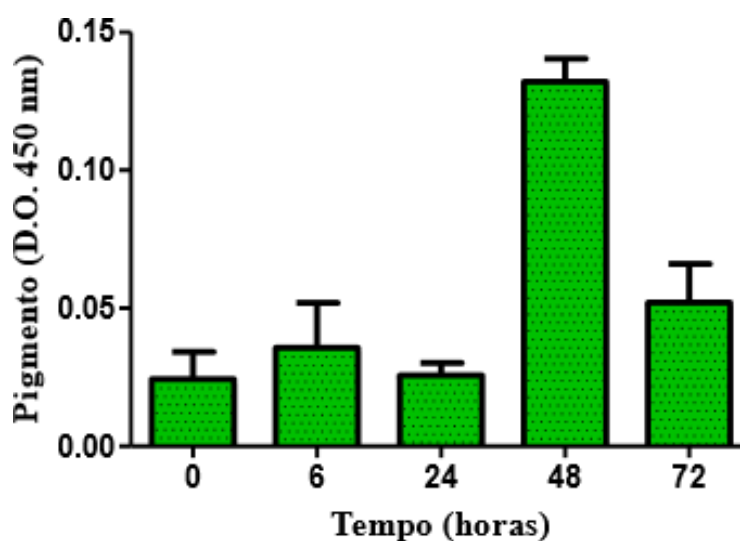


Figura 18: Produção de pigmento do isolado FT9.12.



A produção máxima de pigmento do isolado FT9.12 ocorreu às 48h de fermentação, exibindo o máximo de crescimento de biomassa com densidade óptica de $9,763(\pm 0,5317)$ no comprimento de onda de 600 nm, correspondente ao final da fase estacionária e início da fase de declínio, e em seguida, teve uma diminuição considerável na produção de pigmento. A produção de pigmento às 48h de fermentação exibiu densidade óptica de $0,1060(\pm 0,0454)$ no comprimento de onda de 450nm.

No isolado FT5.10, a produção de pigmento continuou aumentando até as 72h de fermentação, apresentando o máximo de crescimento de biomassa com densidade óptica de $8,791(\pm 0,9036)$ no comprimento de onda de 600 nm, neste momento o isolado FT5.10 estava entrando na fase estacionária, exibindo, para a produção de pigmento, densidade óptica de $0,1241(\pm 0,1187)$ no comprimento de onda de 450nm.

6.4 Caracterização dos pigmentos carotenoides por HPLC

A análise em HPLC dos dois isolados forneceu os seguintes cromatogramas (Figuras 19 e 20):

Figura 19: Perfil do cromatograma do isolado FT9.12 exibindo pico a 3,9 minutos (a).

Espectro UV de absorção do isolado FT9.12 a 3,9 minutos (b):

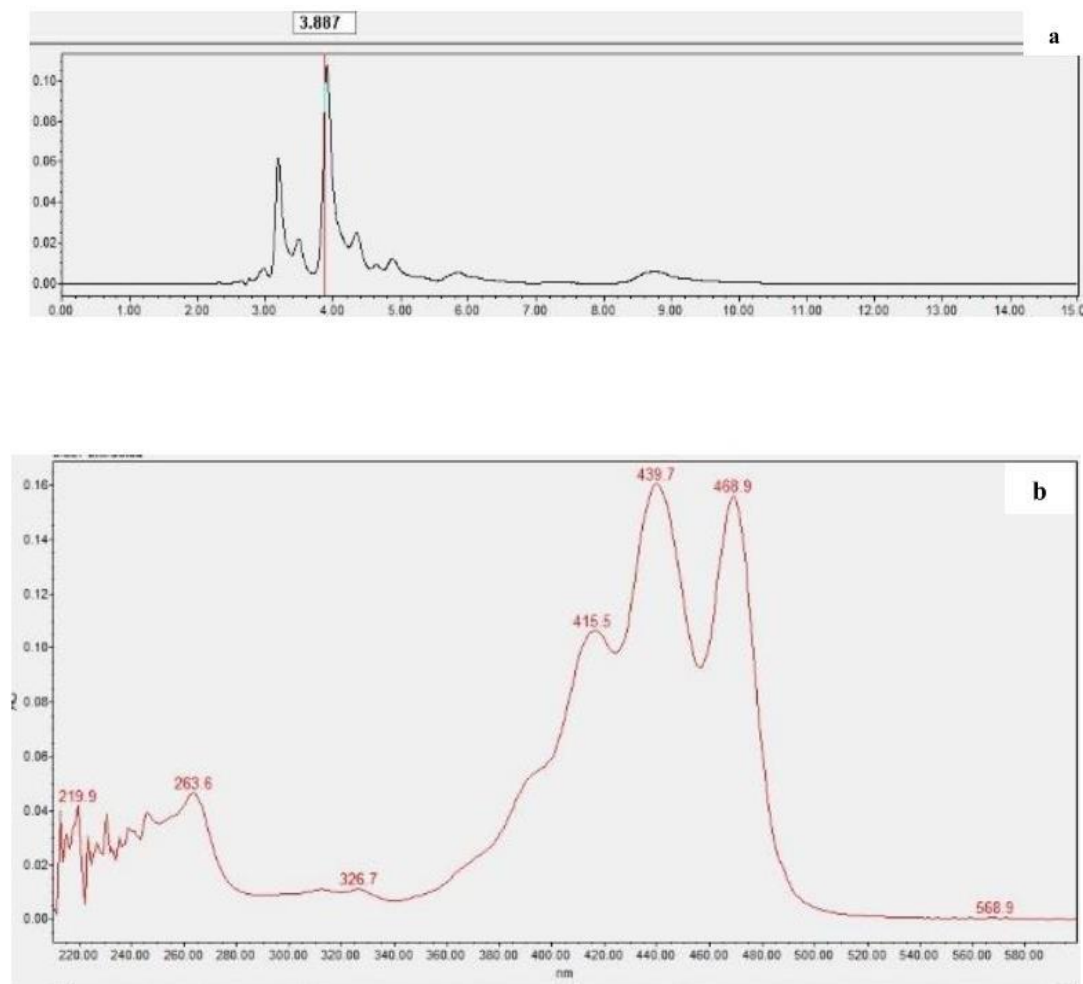
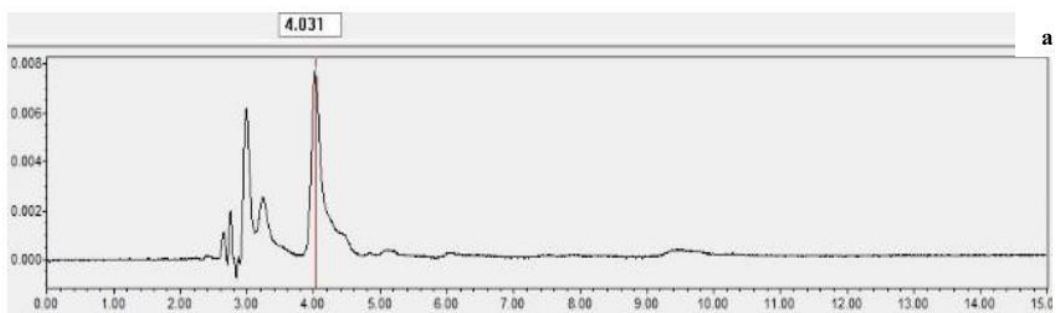
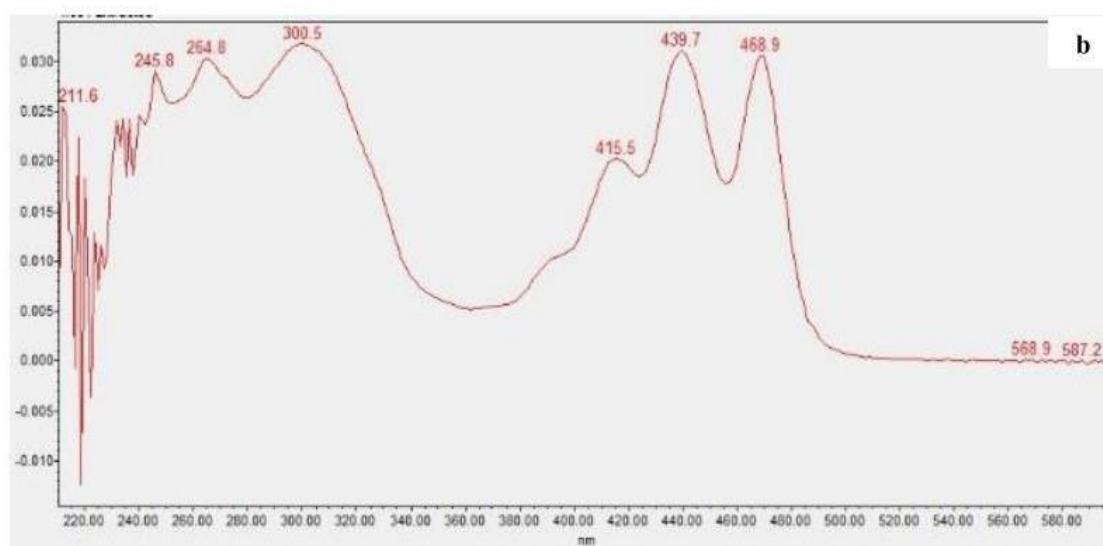


Figura 20: Perfil do cromatograma do isolado FT 5.10 exibindo pico a 4,0 minutos (a).

Espectro UV de absorção do isolado FT5.10 a 4,0 minutos (b):





O tempo de retenção, o comprimento de onda e concentração dos compostos majoritários dos isolados de *M. luteus* se encontram na tabela abaixo:

Tabela 4: Dados obtidos na análise por HPLC dos extratos brutos dos isolados FT5.10 e FT9.12.

Isolado	TR (minutos)	Comprimento de onda λ máximo (nm)	Concentração (mg/mL)
FT 5.10	4,0	415,5; 439,7; 468,9	0,74
FT 9.12	3,9	415,5; 439,7; 468,9	12,01

Análises realizadas por HPLC do isolado FT9.12 mostrou um composto majoritário com tempo de retenção de 3,9, com o máximo de absorção de 415,5; 439,7; 468,9 nm e a concentração de 12,01 mg/L, respectivamente.

O isolado FT5.10 mostrou um composto predominante similar, entretanto com a concentração 12 vezes menor. Este resultado está de acordo com a análise visual da produção de pigmento pois a tonalidade do amarelo no isolado FT9.12 é mais intenso que o observado no isolado FT5.10.

Comparando com as seguintes leveduras que são referência na produção de beta-caroteno, a levedura *Rhodotorula rubra* NRRL Y-15596, que atinge uma média de produção

de 1,04mg/L, o isolado FT9.12 produziu 12 vezes mais pigmento carotenóide e o isolado FT 5.10, 1,4 vezes a menos. Comparando com a levedura *Rhodotorula glutinis var glutinis*, que atinge uma média de produção de 7,37mg/mL (BHOSALE; GADRE, 2001), o isolado FT9.12 produziu 1,6 vezes mais pigmento carotenóide e o isolado FT5.10, 10 vezes a menos.

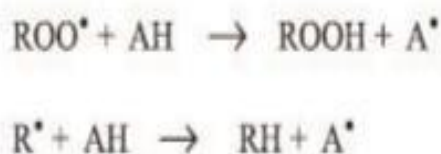
6.5 Atividades antioxidantes

Os pigmentos carotenóides têm a capacidade de atuar como antioxidantes, e por isso, protegem as células contra a fotooxidação. Eles possuem capacidade para desativar espécies reativas de oxigênio e sequestrar radicais livres (EDGE; MCGARVEY; TRUSCOTT, 1997).

As espécies reativas de oxigênio englobam moléculas altamente reativas resultantes do metabolismo do oxigênio, assim como espécies que não possuem radicais livres, mas que são agentes oxidantes e podem gerar radicais, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o oxigênio singlete. As espécies reativas de oxigênio são formadas em três etapas: “iniciação”, que é caracterizada pela formação da espécie reativa, “propagação”, que ocorre quando a espécie reativa reage com um substrato, e “cessação”, que é a interrupção da reação em cadeia (GOMES, 2007).

Os carotenóides atuam atrasando ou inibindo o momento da “iniciação” ou interrompendo a “propagação” (RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009). A figura 21 representa o mecanismo de ação de sequestro de radicais livres.

Figura 21: Mecanismo de ação de sequestro de radicais livres por antioxidantes.



Fonte: Frankel (1980).

Onde:

ROO[•] e R[•]: radicais livres;

AH: antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo;

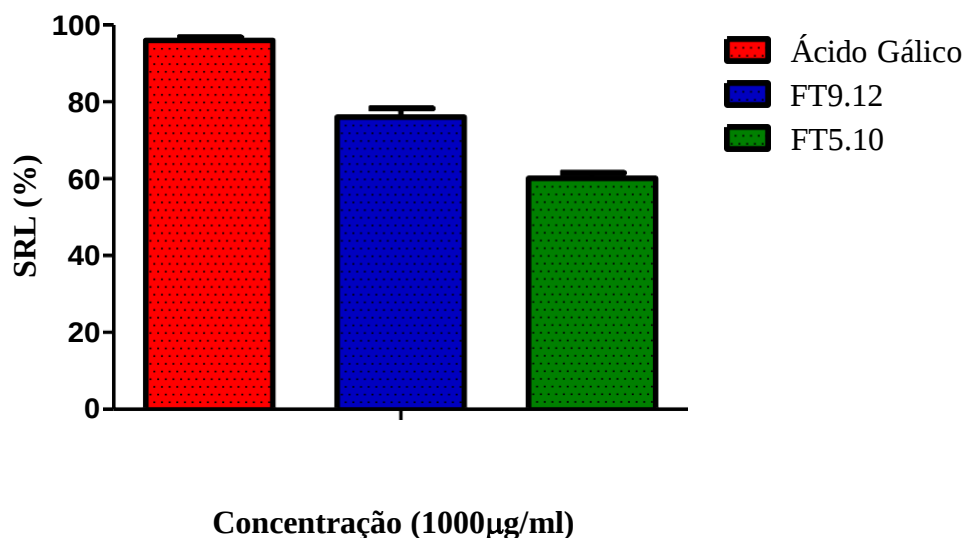
A[•]: radical inerte.

As avaliações das atividades antioxidantes que se fundamentam no sequestro de radicais livres (ABTS e DPPH) dos extratos dos isolados de *M. luteus* estão descritas a seguir.

6.5.1 Método DPPH

O extrato metanólico bruto do isolado FT5.10 exibiu como percentagem de sequestro do radical livre, 60,16(±1,14) % na concentração de 1000 µg/mL. O extrato metanólico bruto do isolado FT9.12 exibiu como percentagem de sequestro do radical livre, 76,06(±2,2) % na concentração de 1000 µg/mL. O ácido gálico apresentou atividade de sequestro maior que os dois extratos na mesma concentração (Figura 22).

Figura 22: Percentagem de sequestro de radical livre DPPH[•] dos isolados FT9.12 e FT5.10.



O tratamento estatístico revelou diferença significativa ($p < 0.0001$) entre o extrato do isolado FT9.12 e o Ácido Gálico e entre o extrato do isolado FT5.10 e o Ácido Gálico.

Lee e colaboradores (2014) analisaram a atividade de sequestro de radical livre DPPH[•] de extratos de isolado de *Streptomyces* coletado do solo da montanha Hambak, localizado na Coreia. Os extratos brutos extraídos em acetato de etila na concentração de 1000µg/mL mostrou atividade sequestradora do radical livre de DPPH de 81,2 (±0,2) %. O extrato metanólico bruto

do isolado FT9.12 apresentou atividade de sequestro de radical livre DPPH• 1,06 vezes mais baixo na mesma concentração. O extrato metanólico bruto do isolado FT5.10 apresentou 1,34 mais baixo na concentração de 1000 µg/mL.

Ser e colaboradores (2015) analisando o extrato em DMSO de *Streptomyces pluripotens* MUSC 137 isolada do solo na Malásia, exibiu atividade sequestradora do radical livre de DPPH• de 23,24(±5,0) a 1000µg/mL. Comparando com os dados obtidos, o extrato de FT9.12 apresentou atividade 3,27 vezes superior e o extrato do isolado FT5.10, 2,58 vezes superior para a mesma concentração.

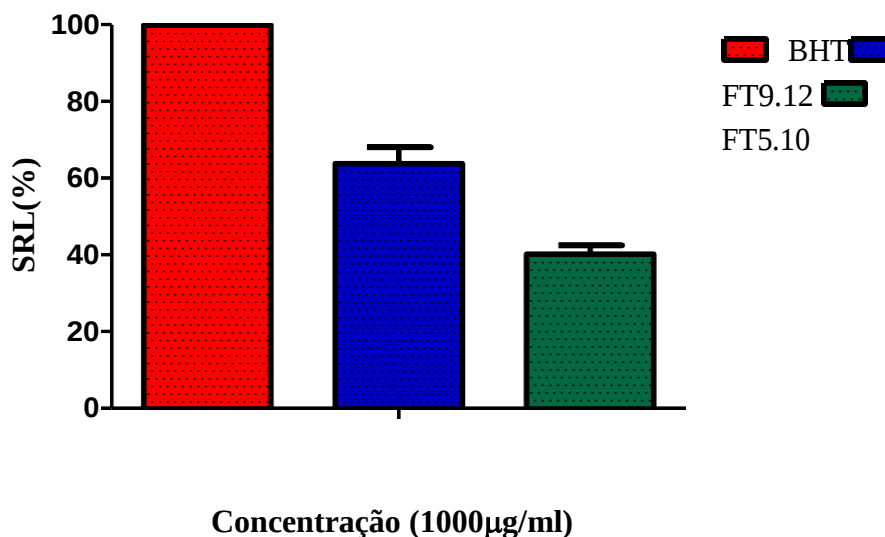
Pawar e colaboradores (2015) avaliaram a atividade de sequestro de radicais livres DPPH• dos extratos de bactérias pigmentadas que estavam associadas a algas marinhas. Os extratos metanólicos brutos das bactérias *Pseudomonas Koreensis* e *Serratia rubidaes*, todas na concentração 1000 µg/mL, apresentaram os seguintes resultados: 47,3(±0,77) % e 18,0 (±0,17) %, respectivamente. Esses resultados são 1,60 e 4,23 mais baixos que o valor obtido para o isolado FT9.12, respectivamente, e, 1,27 e 3,34 mais baixos que o valor obtido para o isolado FT5.10, respectivamente.

Os dados obtidos dos extratos dos dois isolados comparados com os resultados de outras pesquisas mostraram uma boa atividade de sequestro de radicais livres DPPH• dos extratos metanólicos brutos dos isolados FT9.12 e FT5.10.

6.5.2 Método ABTS

O extrato metanólico do isolado FT9.12, na concentração de 1000µg/mL, exibiu o valor de percentagem de sequestro de 63,82(±4,233) %, que é 1,58 vezes superior ao obtido para o extrato metanólico do isolado FT5.10 na mesma concentração, que apresentou 40,22(±2,272) % (Figura 23). O BHT foi utilizado como padrão. O tratamento estatístico revelou diferença significativa ($p < 0,0001$) entre o extrato do isolado FT9.12 e o BHT e entre o extrato do isolado FT5.10 e o BHT.

Figura 23: Percentagem de sequestro de radical livre ABTS^{•+} dos isolados FT9.12 e FT5.10



Lee e colaboradores (2015) analisando o extrato de *streptomyces sp.* MJM 8637 em acetato de etila obtiveram para a capacidade de sequestro do radical livre ABTS^{•+} o valor de 81,2(±4,5) % na concentração de 1000µg/mL. Os extratos metanólicos dos isolados FT9.12 e FT5.10 obtiveram, na mesma concentração, o valor de 63,82(±4,233) % e 40,22(±2,272) %, valores 1,27 e 2,00 vezes inferiores ao obtido do extrato de *streptomyces sp.*, respectivamente.

Pawar e colaboradores (2015) avaliaram os extratos de bactérias pigmentadas que estavam associadas a algas marinhas como método ABTS. Os extratos metanólicos brutos das bactérias *Pseudomonas Koreensis* e *Serratia rubidaes*, todas na concentração 1000 µg/mL, apresentaram os seguintes resultados: 19,2(±0,05) %, 7,2(±0,03) %, respectivamente. O extrato do isolado FT9.12 apresentou atividade de sequestro do ABTS^{•+} 3 e 9 vezes superior e o extrato do isolado FT 5.10 foi 2 e 5 vezes superior aos valores obtidos de *Pseudomonas Koreensis* e *Serratia rubidaes*, respectivamente.

Os dados obtidos dos extratos dos dois isolados comparados com os resultados de outras pesquisas mostraram uma boa atividade de sequestro de radicais livres ABTS^{•+} dos extratos metanólicos brutos dos isolados FT9.12 e FT5.10.

6.6 Determinação do Fator de proteção Solar (FPS)

A exposição aos raios ultravioletas é prejudicial aos seres vivos causando danos a macromoléculas como o DNA, RNA, proteínas e lipídeos. Várias estratégias foram desenvolvidas pelos seres vivos para minimizar os efeitos prejudiciais dos raios UV. Uma

forma de proteção é a produção de pigmentos carotenoides que sequestram espécies reativas de oxigênio que são formados pela indução dos raios UV (COLABELLA; MOLINÉ; LIBKIND, 2014).

Compostos químicos que apresentam propriedades antioxidantes podem ser incorporados a formulações de protetor solar, devido à sua eficácia na redução dos efeitos de radicais livres na pele (DARVIN *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2015). Uma forma de medir a eficácia de proteção aos efeitos nocivos dos raios UVB é a determinação do Fator de Proteção solar (FPS) (ARAUJO; SOUZA 2008).

Para a determinação do Fator de Proteção Solar dos extratos metanólicos dos isolados de *M. luteus* foi analisado o perfil do espectro de absorbância obtido entre os comprimentos de onda: 290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320 nm.

O perfil do espectro de absorbância dos extratos metanólicos dos isolados de *M. luteus* estão representados abaixo (Figuras 24 e 25). Estes resultados foram submetidos a um tratamento matemático já descrito anteriormente, e os valores do FPS do extrato metanólico bruto de cada isolado foi determinado (Tabela 5): o extrato do isolado FT9.12 apresentou 3,59 ($\pm 0,64$) e o extrato do isolado FT 5.10, 4,26 ($\pm 0,83$).

Figura 24: Perfil do espectro de absorção do extrato do isolado FT9.12.

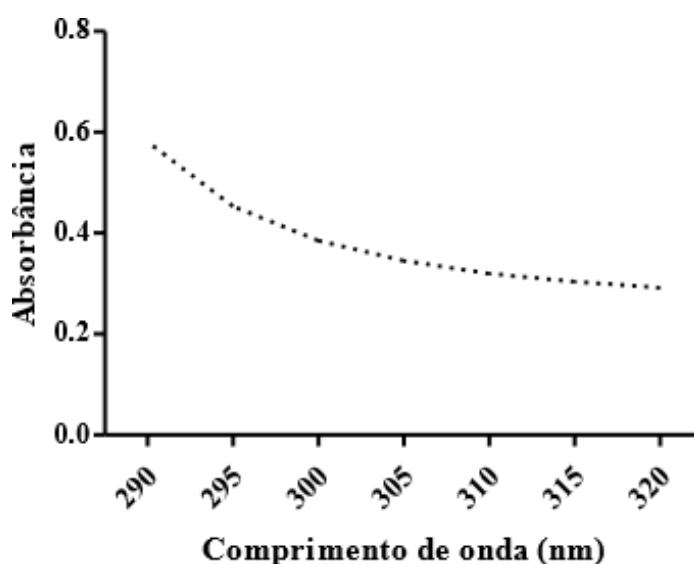


Figura 25: Perfil do espectro de absorção do extrato do isolado FT5.10

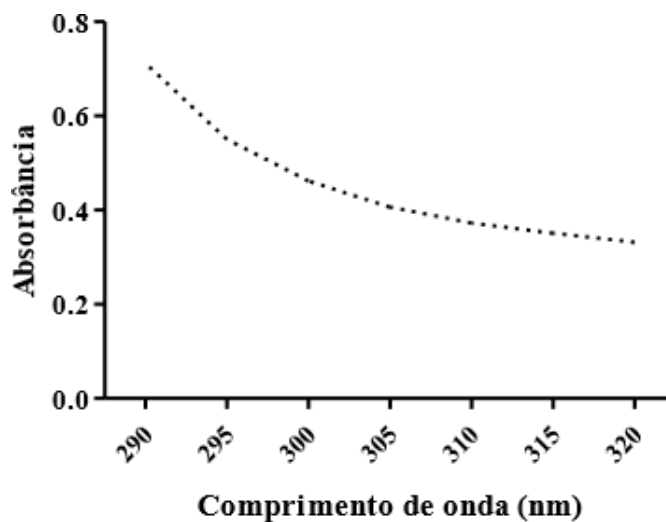


Tabela 5: Valores do FPS do extrato metanólico bruto dos isolados FT5.10 e FT9.12.

FPS	Média ($\pm$ SD)
FT 5.10	4,26 ($\pm$ 0,83)
FT 9.12	3,59 ($\pm$ 0,64)

A Resolução - RDC N° 30 de 1° de junho de 2012 alterou o valor mínimo de FPS de 2,0 para 6,0 que um protetor solar deva possuir (BRASIL, 2012). Os extratos dos isolados bacterianos se encontram abaixo do estipulado por esta resolução, entretanto, os compostos bioativos podem agir em sinergismo com os filtros orgânicos aumentando o valor do FPS.

Pesquisas realizadas por Oliveira e colaboradores (2015) demonstraram que a adição de rutina 0,1% (p/p), cujo valor de FPS é 4,72($\pm$ 0,20), em um protetor solar contendo o filtro orgânico benzofenona-3 a 6,0% (p/p) aumentou o valor do FPS *in vitro* em 54%, de 24,3($\pm$ 1,53) para 33,3($\pm$ 2,89).

Suryawanshi e colaboradores (2015) avaliaram os pigmentos prodigiosina e violaceína, obtidos das bactérias *Serratia marcescens* e *Chromobacterium violaceum*, respectivamente, como aditivos em protetor solar comercial. Três protetores solares comerciais com FPS 15, 24 e 40 foram utilizados no estudo e antes de iniciar o experimento os valores de FPS destes protetores solares comerciais foram novamente determinados, os valores encontrados foram: 16,46 ($\pm 0,83$), 26,64 ($\pm 0,58$) e 39,48 ($\pm 0,73$), respectivamente. A adição de prodigiosina (4% p/p) em cada protetor solar aumentou o FPS para 27,72 ($\pm 0,66$), 37,89 ($\pm 0,97$) e 47,59 ($\pm 0,78$), respectivamente. A adição de violaceína (4% p/p) em cada protetor solar aumentou o FPS para 19,66 ($\pm 0,6$), 32,63, ($\pm 0,89$) e 43,79 ($\pm 0,86$), respectivamente. Dessa forma, a adição de prodigiosina resultou no aumento de 65%, 42% e 20% nos valores de FPS de 15, 24 e 40 dos protetores solares, respectivamente, e a adição de violaceína resultou no aumento de 19%, 22% e 10% no FPS, respectivamente. Entretanto, os pigmentos isolados não foram capazes de gerar qualquer valor do FPS substancial.

Jarzycka e colaboradores (2013), investigaram a eficácia de formulações de protetor solar contendo o extrato de *Helichrysum arenarium*, *Sambucus nigra*, *Crataegus monogyna* e suas combinações. Estas plantas são ricas em compostos fenólicos e também apresentam outros compostos, tais como, vitaminas, carotenoides, flavonoides, etc. Seus extratos apresentaram FPS *in vitro* iguais a 6,80($\pm 0,26$), 6,00($\pm 0,42$) e 9,88($\pm 1,66$), respectivamente. Os valores dos FPS das associações dos extratos de *H. arenarium* e *C. monogyna*; *C. monogyna* e *S. nigra* e, *S. nigra* e *H. arenarium* foram 19,51 ($\pm 4,19$); 18,21 ($\pm 5,24$), 16,94 ($\pm 3,76$), respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que as formulações que continham combinações agiram em sinergismo. Ou seja, os compostos bioativos podem agir em sinergismo com um filtro solar orgânico como também podem agir em sinergismo entre eles.

Os carotenoides podem ser utilizados como agente bioativo em formulações fotoprotetoras devido as suas propriedades biológicas de proteção do organismo contra a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da radiação UV. Os carotenoides absorvem luz na faixa de 350-500 nm e essa faixa de absorção confere uma proteção ampla do espectro e, portanto, a absorção dos carotenoides nesta faixa iria proporcionar uma proteção complementar e aumentar a proteção de radiação acima de 400 nm pelos protetores solares (STAFSNEs *et al.*, 2010).

Estudos envolvendo carotenoides em formulações de proteção solar demonstraram a sua eficácia. Kar (2002), desenvolveu um protetor solar contendo beta-caroteno e observou

que ele foi eficaz e seguro para o tratamento de melasma. Além disso, os carotenoides são utilizados como agentes de proteção solar para administração oral.

7. CONCLUSÃO

- A identificação dos 20 isolados bacterianos através da amplificação por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) do gene ribossomal 16S rDNA demonstrou a presença de diferentes espécies como *Micrococcus luteus*, *Leifsonia shinshuensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Kocuria palustris*, *Serratia marcescens* e *Microbacterium testacium*;
- A análise intraespécies dos isolados de *Micrococcus luteus* com o REP-PCR demonstrou 6 perfis genéticos distintos o que pode corroborar com os dados fenotípicos, quanto a diferenças na intensidade de pigmentação desses isolados;
- Os resultados das provas bioquímicas dos isolados de *Micrococcus luteus* corroboram com a identificação molecular dos isolados pelo gene ribossomal 16S rDNA;
- Análises realizadas em HPLC dos isolados de *Micrococcus luteus* provenientes do Semiárido brasileiro sugerem que estes isolados produzem um pigmento amarelo, provavelmente sarcinaxantina, um carotenoide raro com 50 carbonos, e demonstram potencial para serem utilizados como fonte de corante natural;
- Os extratos de *Micrococcus luteus* demonstram possuir potencial para atuar como antioxidantes;
- A determinação do FPS dos isolados de *Micrococcus luteus* demonstra que eles possuem potencial para atuar como compostos bioativos em formulações fotoprotetoras.

REFERÊNCIAS

- ABEROUMAND, A. A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v.6 n.1, p. 71-78, 2011.
- ALBRECHT M, TAKAICHI S, STEIGER S, WANG Z, SANDMANN G. Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v.18, p. 843–846, 2000.
- ALDHABI, N.A.; ESMAIL, G.A.; DURAI PANDIYAN, V.; • ARASU, M.V.; SALEM-BEKHIT, M.M. Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia. **Extremophiles**, v, 20, p. 79–90, 2016.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. and LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- APGAUA, D.M.G; SANTOS R.M., PERREIRA D.G.S. *et al.* Beta-diversity in seasonally dry tropical forests (SDTF) in the Caatinga Biogeographic Domain, Brazil, and its implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 23, p. 217-232, 2014.
- ARAÚJO, T. S.; SOUZA S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia plena**, v.4, n. 11, 2008.
- ARULSELVI, I.; UMAMAHESWARI, S.; SHARMA, G *et al.* Screening of Yellow Pigment Producing Bacterial Isolates from Various Eco-climatic Areas and Analysis of the Carotenoid Produced by the Isolate. **Journal of Food Processing & Technology**, v.5, n.1 p. 1-4, 2014.
- ASKER D.; OHTA Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n.6, p.617-621, 1999.
- BALOGH, T.S; VELASCO, M.V.R; PEDRIALI, C. A. *et al.* Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732-42, 2011.
- BINIEK, K; LEVI K; DAUSKARDT, R.H. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 109, n. 42, p. 17111–17116, 2012.
- BIRBEN, E. SAHINER, U.M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal** v.5, p. 9-19, 2012.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. **Nature**, v. 181,

p.1199-2000,1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BLOEM, J., DE RUITTER, P.C., KOOPMAN, G.J., LEBBINK, G., BRUSSARD, L. Microbial numbers and activity in dried and rewetted arable soil under integrated and conventional management. **Soil Biology Biochemistry**, v. 24, p.655-665, 1992.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 237, DE 22 DE AGOSTO DE 2002. Aprova regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea0ebf004aee4a7cb7b3bfa337abae9d/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+237,+de+22+de+agosto+de+2002.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 23 de set de 2015.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e15afe804c58f17fb8f0f8dc39d59d3e/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+N%C2%BA+30,+de+1%C2%BA+de+Junho+de+2012.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 23 de set de 2015.

BRASIL. Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e identificação de bactérias de importância medica**. Módulo V, p. 1-9. Brasília: Anvisa, 2004.

BRASIL. Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Módulo VI, p. 1-154, Brasília: Anvisa, 2013.

BHOSALE, P.; GADRE, R.V. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p.12-16, 2001.

CANGANELLA, F.; WIEGEL, J. Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. **Naturwissenschaften**, v.98, p. 253–279, 2011.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v 51, p. 15-25, 2013.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2003.

COLABELLA, F.; MOLINÉ, M.; LIBKIND, D. UV Sunscreens of Microbial Origin: Mycosporines and Mycosporine-like Aminoacids. **Recent Patents on Biotechnology**, v, 8, n, 3, p.179-193, 2014.

CRISTEA, D.; VILAREM, G. Improving light fastness of natural dyes on cotton yarn. **Dyes and pigments**, v.70, p.238-245, 2006.

DARVIN, M.E.; FLUHR, J.W.; MEINKE, M.C.; ZASTROW, L.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals. **Experimental Dermatology**, v.20, p.125–129, 2011.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.2, p. 446-452, 2006.

DUARTE, R.T.D.; NÓBREGA, F.; NAKAYAMA, C.R.; PELLIZARI, V.H. Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology. **International Journal of Astrobiology**, v. 11, n.4, p.325–333, 2012.

EDGE, R.; MCGARVEY, D.J.; TRUSCOTT, T.G. The carotenoids as antioxidants: A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v.41, p. 189-200, 1997.

FLORA, S.J.S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 4, p. 191-206, 2009.

FRANKEL, E.N. Lipid Oxidation. **Progress in Lipid Research**. Kidlington, v.19, n.1, p.1- 22, 1980.

FREITAS, J.V; PRAÇA, F.S.G; BENTLEY, M.V.L.B.; GASPAR, L.R. Transresveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. **International Journal of Pharmaceutics**, v.484, p. 131–137, 2015.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.36, p. 163-180, 2009.

JANARDHAN, A., KUMAR A.P., VISWANATH, B., SAIGOPAL, D.V.R., NARASIMHA, G. Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties. **Biotechnology Research International**, p. 1-8, 2014.

JARZYCKA, A; LEWINSKA, A., GANCARZ, R. WILK, A. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.128, p. 50–57, 2013.

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 53, p. 119-178, 1996.

GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G. *et al.* Re-evaluating

prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.733-739, 2005.

GIOVANNUCCI, E.; KELM, M. A.; RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLET, W. C. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.87, p.1767-1776, 1995.

GOMES, F. S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de nutrição**, v. 20, n. 5, p. 537-548, 2007.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.98, n.2, p.119-142, 2010.

GÖRLACH-LIRA, K. & COUTINHO, H.D.M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 135- 141, 2007.

HALLIDAY, G.M.; CADET, J. It's All about Position: The Basal Layer of Human epidermis Is Particularly Susceptible to Different Types of Sunlight-Induced DNA Damage. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p.132, 265–267, 2012.

HEIDER, S.; PETERS-WENDISCH, P.; WENDISCH, V. Carotenoid biosynthesis and overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. **BMC Microbiology** v.12, p.1471-2180, 2012.

HEIDER, S *et al.* Metabolic engineering for the microbial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50 carotenoids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p.4355–4368, 2014a.

HEIDER, S.A.E.; PETERS-WENDISCH, P.; NETZER, R. *et al.* Production and glucosylation of C50 and C40 carotenoids by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p.1223–1235, 2014b.

HENRIQUEZ, C.; ALIAGA, C.; LISSI, E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. **International Journal of Chemical Kinetics**, v.34, p.659-665, 2002.

ISHII, S.; SADOWSKY, M.J. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. **Environmental Microbiology**, v.11, n.4, p.733–740, 2009.

KABOUCHE, A., KABOUCHE, Z., OZTURK, M., KOLAL, U., TOPCU, G. Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1281–1287, 2007.

KAISER, P.; SURMANN, P.; VALLENTINA, G.; FUHRMANN, H. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. **Journal of Microbiological Methods**, v.70, n. 1, p. 142 -149, 2007.

KAMALA, K.; SIVAPERUMAL, P.; GOBALAKRISHNAN, R.; SWARNAKUMAR, N.S.; RAJARAM, R. Isolation and characterization of biologically active alkaloids from marine

actinobacteria *Nocardiopsis* sp. NCS1. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 4, n.1, p.1-7, 2014.

KANAREK, R.B. Artificial food dyes and attention deficit hyperactivity disorder. **Nutrition Reviews**, v.69, n.7, p. 385-391, 2011.

KAR, H.K. Efficacy of beta-carotene topical application in melasma: An open clinical trial. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, v. 68, n. 6, p. 320-322, 2002.

KISER, P.D.; GOLCZAK, M.; PALCZEWSKI, K. Chemistry of the Retinoid (Visual) Cycle. **Chemical reviews**, v.114, n.1, p. 194-232, 2014.

KLASSEN, J.L., FOGHT, J.M. Characterization of *Hymenobacter* isolates from Victoria Upper Glacier, Antarctica reveals five new species and substantial non-vertical evolution within this genus. **Extremophiles**, v, 15, p. 45–57, 2011.

KOPEC, R.E.; COOPERSTONE, J.L.; CICHON, M. J.; SCHWARTZ, S.J. Analysis Methods of Carotenoids. Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals, First Edition. Published by John Wiley & Sons, Ltd., capítulo 4, pag 105-148, 2012.

KUMAR, P.P.; RAJ, J.P.; CHRISTHUDAS, I.V.S.N. α -Glucosidase inhibition and antioxidante properties of *Streptomyces* sp.: In vitro. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p. 1687-1698, 2014.

LEAL I. R.; J. M. C. SILVA; M. TABARELLI & T. E. LACHER. 2005. Changing the course of biodiversity conservation in the caatinga of northeastern Brazil. **Conservation Biology**, v.19, p.701-706, 2005.

LEE, D.; LEE, S.; CHOI, B.; JINHUA CHENG, J. *et al.*, Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.962-967, 2014.

LOPES, L.T.A.; DE PAULA; J.R.; TRESVENZOL, L.M.F. *et al.* Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de *Citrus limettioides* Tanaka (Rutaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e aplicada**, v. 34, n.4, p.503-511, 2013.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p.1-10, 2013.

LÜ, J.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Molecular Medicine** v.14, n. 4, p. 840-860, 2010.

LUCENA, B.T.L.; SANTOS, B.M.; MOREIRA, J.L.S.; MOREIRA, A.P.B.; NUNES, A;C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A., THOMPSON, F.L., DE MORAIS JR M.A. Diversity of Lactic Acid Bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v.10 p. 298, 2010.

MANDELLI, F.; MIRANDA, V.S; RODRIGUES, E; MERCADANTE, A.Z. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p.1781–1790, 2012.

MANNISTO, S., SMITH-WARNER, S.A., SPIEGELMAN, D. et al., Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. **Cancer epidemiology biomarkers prevention**, v.13, p.40-48, 2004.

MAPARI, S.A.S.; MEYER, A.S.; THRANE, U. e FRISVAD, J.C.-Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**, v 8, n.24, p. 1-15, 2009.

MARTIN, V.J.J.; PITERA, D.J.; SYDNOR T WITHERS, S.T. *et al.* Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 796-802, 2003.

MATA-GÓMEZ, L.C.; MONTAÑEZ, J.C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A; AGUILAR, C.N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts an overview. **Microbial cell factories**, v.13, n.12, p.1-11, 2014.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I.M; HEREDIA, F.J. Review: Analysis of carotenoids in orange juice. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 638-649, 2007.

MENEZES, K.A.S., NUNES, G.F.O., SAMPAIO, A.A., AIDAR, S.T., LINDETE MÍRIA VIEIRA MARTINS, L.M.V., FERNANDES-JÚNIOR, P.I. Seedling development of nodulating and non-nodulating native legumes in soils from Brazilian Caatinga biome. **Plant Science Today**, v.2, n.2, p.56-59, 2015.

MIKI W, OTAKI N, YOKOYAMA A, IZUMIDA H, SHIMIDZU N. Okadaxanthin, a novel C50-carotenoid from a bacterium, *Pseudomonas* sp. KK10206c associated with marine sponge, *Halichondria okadai*. *Experientia*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n.7, p.684–686, 1994.

MIKOLASCH, A.; HILDEBRANDT, O; SCHLÜTER, R.; HAMMER, E.; WITT, S.; LINDEQUIST, U. Targeted synthesis of novel β -lactam antibiotics by laccase-catalyzed reaction of aromatic substrates selected by pre-testing for their antimicrobial and cytotoxic activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p.1-15 2016.

MOHANA, D.C.; THIPPESWAMY, S.; ABHISHEK R.U. Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. **Radiation Protection and Environment**, v. 36, n.4, 2013.

MOROZKINA, E.V., SLUTSKAYA ES, FEDOROVA TV, TUGAY TI, GOLUBEVA LI, KOROLEVA OV. Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46: p. 1–14, 2010.

MOURA, P.A., BEZERRA FILHO C.M., DA SILVA L.C.N., SILVA, M.V. E CORREIA

M.T.S. Caatinga plants as weapons against microorganisms: advances and challenges. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs. Ed. A. Méndez-Vilas, p. 117-124, 2015.

NETZER, R.; STAFSNES, M. H; ANDREASSEN, T.; GOKSØYR, A.; BRUHEIM P.; TRYGVE B. Biosynthetic Pathway for γ -Cyclic Sarcinaxanthin in *Micrococcus luteus*: Heterologous Expression and Evidence for Diverse and Multiple Catalytic Functions of C50 Carotenoid Cyclases. **Journal of Bacteriology**, v, 192, N 21, p. 5688–5699, 2010.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free radical biology & medicine**, v.49, p.503-505, 2010.

OLIVEIRA, A.P.G., SABINO, S.M., GANDINE, S.M., MOULIN, T., AMARAL, A.A. Importância das actinobactérias em processos ecológicos, industriais e econômicos. **Enciclopédia Biosfera**, v.18, p.3938-3952, 2014.

OLIVEIRA, C. A. *et al.* Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 148, p. 154-159, 2015.

PAWAR, R.; MOHANDASS, C.; SIVAPERUMAL, E.; SABU, E. *et al.* Epiphytic marine pigmented bacteria: A prospective source of natural antioxidants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n.1, p. 29-39, 2015.

PRIETO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, n.337–341, 1999.

POLEFKA, T.G; MEYER, T.A; PATRICIA P AGIN, P.P; BIANCHINI R.J. Effects of Solar Radiation on the Skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, n.11, p. 134–143, 2012.

RIVERA, S.M.; CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, v.1224, p.1-10, 2012.

RIOS, A.O.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Proteção de carotenoides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.20, n.2, p. 343-350, 2009.

RODRIGUES-AMAYA, B. D. **A Guide to Carotenoids Analysis in Foods**. Washington, D.C.: International Life Science Institute Prece, p. 2-14, 1999.

RODRÍGUES-CONCEPCIÓN, M.; BORANAT, A. Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. **Current opinion in Plant Biology**, v.25, p.17-22, 2015.

RODRÍGUEZ-ROJO, A.; VISENTIN, D.; MAESTRI, M., COCERO, J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v.109, p. 98– 103, 2012.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; ANNA PROTEGGENTE *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9, p.1231–1237, 1999.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS + . Comunicado Técnico, 128. 2007.

SAHOO, A. K.; GUPTA, PAL, A. Photocatalytic degradation of Crystal Violet (C.I. Basic Violet 3) on silver ion doped TiO₂. **Dyes and pigments**, v. 66, p. 189-196, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory Manual**, 2ª edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANDRIN, T.R.; MAIER, R.M. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p.1093-1101, 2003.

SANTOS, J.C, ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; FERNANDES, G. W. Richness of gall-inducing insects in the tropical dry forest (caatinga) of Pernambuco. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.55, n.1, p. 45–54, 2011.

SARANYA, C.; HEMALATHA, A.; PARTHIBAN, C.; ANANTHARAMAN, P. Evaluation of Antioxidant Properties, Total Phenolic and Carotenoid Content of *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella salina* and *Isochrysis galbana*. **International Journal Current Microbiology Applied Sciences**, v. 3, n.8, p.365-377, 2014.

SCOTTER, M. - Emerging and persistent issues with artificial food colours: natural colour additives as alternatives to synthetic colours in food and drink. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 3, p. 28-39, 2011.

SEIFRIED, H. E. *et al.* A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v 18, n. 9, p.567-579, 2007.

SER, H.; MUTALIB, W.; YIN, W. *et al.* Evaluation of antioxidative and citotoxic activities of *Streptomyces* pluripotents MUSC 137 isolated from Mangrove soil in Malaysia. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1-11, 2015.

SHEN, Y.; ZHANG, X.; PRINYAWIWATKUL, W.; XU.Z. Simultaneous determination of red and yellow artificial food colourants and carotenoid pigments in food products. **Food Chemistry**, v. 157, p. 553-558, 2014.

SILVA, V.M.A.; MARTINS, C.M.; MARTINS, S.C.S. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia biosfera**, v.11 n.21, p. 2026, 2015.

SILVA, V.M.A.S.; BRITO, F. A. E., RAMOS, K.A., SILVA R. M., MARTINS, C.M., MARTINS, S.C.S. Atividade Enzimática de Actinobactérias do Semiárido. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.08, p. 560-572, 2015.

STAFSNES, M.H; JOSEFSEN, K.D.; KILDAHL-ANDERSEN, G.; VALLA; S.; ELLINGSEN, T.E.; BRUHEIM, P. Isolation and characterization of marine pigmented bacteria

from Norwegian coastal waters and screening for carotenoids with UVA-blue light absorbing properties. **The Journal of Microbiology** v. 48, n.1, p. 16-23, 2010.

STAHL W; SIES H. b-Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, p: 1179-1184, 2012.

VALDUGA, E., TATSCH P.O., TIGGEMANN L. *et al.*, produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, vol. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

SURYAWANSHI, R.K.; PATIL, C.D.; BORASE, H.P.; NARKHEDE, C.P. *et al.*, Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, v, 37, p. 98–107, 2015.

TIAN, S.; PU, X.; LUO, X. *et al.* Isolation and Characterization of New p-Terphenyls with Antifungal, Antibacterial, and Antioxidant Activities from Halophilic Actinomycete *Nocardiopsis gilva* YIM 90087. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, p. 3006–3012, 2013.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

UMADEVI, K.; KRISHNAVENI, M. Antibacterial activity of pigment produced from *Micrococcus luteus* KF532949. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v.4, p. 149-152, 2013.

VELASCO, M.V.R; SARRUF, F.D; SALGADO-SANTOS, I.M.N *et al.* Broad spectrum bioactive sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 50-57, 2008.

VELASCO, M.V.R; BALOGH, T.S; PEDRIALI, C.A. *et al.* Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) – revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n.1, p. 27-34, 2011.

VENTURA, M., CANCHAYA, C., CHANDRA, G., FITZGERALD, G. F., CHATER, K.F., SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, p. 495-548, 2007.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, p. 25-40, 1994.

WARDLE, D.A. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global - scale synthesis. **Soil Biology Biochemistry**, v.30, p.1627-1637, 1998.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991.

WILLEY, J.M., SHERWOOD, L., WOOLVERTON, C.J. AND PRESCOTT, L.M., Prescott, Harley and Klein's microbiology. McGraw-Hill Higher Education, New York, 2008.

ZHUANG, W.Q., TAY, J.H., MASZENAN, A.M., KRUMHOLZ, L.R. AND TAY, S.T. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil contaminated tropical marine sediments. **Letters in Applied Microbiology Journal**, v. 36, p.251-257, 2003.