POTENCIAL BIOATIVO DE MELANINA SINTETIZADA POR ESPÉCIES ENDOFÍTICAS DE *Pseudomonas* ASSOCIADAS A *Cereus peruvianus* (Cactaceae).

Mirella Esteves Cesário de Souza (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jesieli Beraldo Borrazzo Maria de Fátima Pires da Silva Machado. E-mail: mfpsmachado@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Microbiologia

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Bactérias endofíticas; Compostos bioativos; Fotoproteção; Radiação ultravioleta.

RESUMO

As melaninas são biopolímeros naturais de estrutura heterogênea, amplamente distribuídos entre organismos, que apresentam importantes propriedades biológicas, como atividade antioxidante e fotoprotetora, em microrganismos, esses pigmentos podem atuar como mecanismos de adaptação a condições ambientais adversas, contribuindo para a proteção celular contra estresse oxidativo e radiação ultravioleta (UV), a produção microbiana de melanina também apresenta potencial biotecnológico devido às suas características funcionais e às possibilidades de aplicação nas áreas farmacêutica, cosmética e biomédica. Nesse contexto, a espécie *Cereus peruvianus* (Caryophyllales: Cactaceae), adaptada a ambientes áridos e semiáridos, apresenta condições ambientais que favorecem a ocorrência de microrganismos com mecanismos de tolerância a estresses, constituindo um nicho de interesse para a investigação de metabólitos bioativos, bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* associadas a essa cactácea apresentam potencial para a produção de melanina, pigmento cuja capacidade de absorção de radiação e atividade antioxidante pode contribuir para a proteção frente a diferentes formas de estresse. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante da melanina sintetizada por bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* isoladas de *C. peruvianus*, contribuindo para a caracterização de seu potencial biotecnológico, os resultados demonstraram potencial antioxidante das melaninas, com variações entre as linhagens e os métodos avaliados, no ensaio de DPPH, destacaram-se as linhagens CR11 e CR7, enquanto no ensaio de FRAP, a linhagem CR18 apresentou a maior capacidade de redução do ferro.

INTRODUÇÃO

As melaninas são compostos poliméricos de estrutura heterogênea, caracterizados pela presença de unidades derivadas de compostos indólicos e responsáveis por grande parte das colorações preta, marrom e cinza observadas em plantas, animais e microrganismos (CORDERO; CASADEVAL, 2020). As melaninas produzidas naturalmente por microrganismos desempenham funções importantes na adaptação,

sobrevivência e sucesso ecológico de diversas espécies em diferentes habitats (SAJJAD et al., 2020), em bactérias, a produção desses pigmentos pode constituir uma estratégia adaptativa frente a condições ambientais adversas, atuando como um mecanismo de fotoproteção que pode reduzir os danos provocados pela exposição à radiação. A capacidade de sintetizar melanina pode favorecer a sobrevivência bacteriana em ambientes submetidos a condições extremas, incluindo regiões desérticas, ambientes polares, ecossistemas marinhos e tecidos de organismos hospedeiros, como as plantas (CHEN et al., 2023; RUSTAMOVA et al., 2020). Além disso, podem apresentar diversas propriedades biológicas de interesse, destacando-se a atividade antioxidante. Assim, além de sua importância ecológica as melaninas apresentam potencial como agentes bioativos, despertando interesse para aplicações nos setores farmacêutico, cosmético, medicinal e em outras áreas biotecnológicas (SONG et al., 2023).

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Bactérias endofíticas associadas a plantas de *C. peruvianus* regeneradas in vitro (CR), conforme descrito por Beraldo-Borrazzo et al. (2021b), foram selecionadas de acordo com a capacidade de sintetizar melanina em meio de cultivo TSB (caldo triptona de soja) suplementado com tirosina, as linhagens produtoras de melanina avaliadas correspondem à espécie *Pseudomonas stutzeri* (Pseudomonadales: Pseudomonadaceae) (CR01, CR02, CR07, CR08, CR11, CR17, CR18).

4.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das melaninas foi avaliada por meio de duas metodologias: DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power, ou Poder Antioxidante de Redução do Ferro). Para o método do radical DPPH, foi utilizada a metodologia conforme Ma et al. (2011), em que foram adicionados 25 µL das amostras e 2 mL da solução de DPPH a 62,5 µmol.L^{-1} em tubos de vidro protegidos da luz, mantidos no escuro durante 30 min. Foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 517 nm, s resultados foram expressos em mmol Trolox/mg da amostra, após a construção de uma curva padrão com solução de Trolox. Para o método FRAP, foi utilizada a metodologia segundo Rufino et al. (2006), com modificações, o reagente foi preparado com tampão acetato 0,3 mol.L^{-1}, solução de TPTZ 10 mmol.L^{-1} e uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mmol.L^{-1}, na proporção 10:1:1 (v/v/v), em ambiente escuro, foram transferidos 100 µL da amostra para tubos de ensaio, acrescentando-se 300 µL de água destilada e 3 mL do reagente FRAP, a mistura foi mantida em banho-maria a 37 °C e, após 30 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de DPPH, os maiores valores de atividade das melaninas na concentração de 0,5 mg/mL foram observados para as cepas CR11 e CR7, com equivalente a 208 mmol/L e 201,33 mmol/L de Trolox, respectivamente, o menor valor obtido foi da CR2, equivalente a 161,3 mmol/L de Trolox, enquanto a CR8 não apresentou atividade antioxidante neste teste (Figura 1).

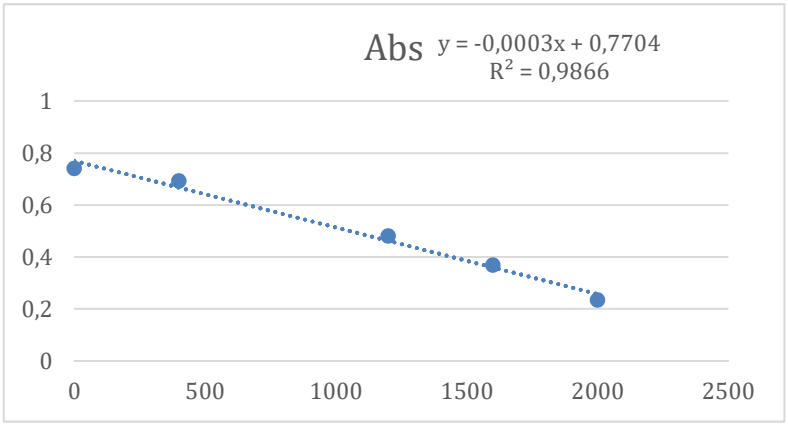


Figura 1. Curva de calibração do padrão Trolox para determinação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical catiônico DPPH

Já no teste FRAP, todas as melaninas apresentaram atividade antioxidante em concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, sendo observados altos valores de atividade de redução do ferro, em detaque, a cepa CR18 (1mg/mL) apresentou valor equivalente a 1558,33 mmol/L de Trolox, semelhante ao controle de sulfato ferroso a 2 mmol/L, correspondente a 1571,67 mmol/L de Trolox. Novamente, a linhagem CR2 (1 mg/mL) foi a que apresentou menor atividade 635 mmol/L de Trolox (Figura 2).

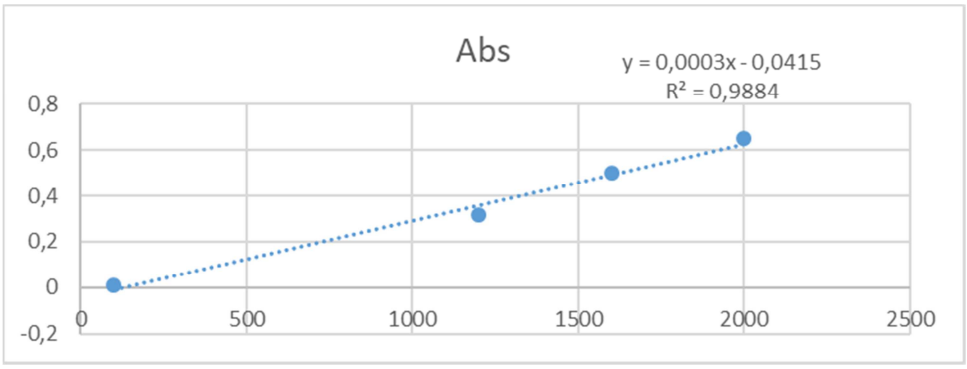


Figura 2. Curva de calibração padrão de Trolox obtida para o ensaio de poder antioxidante de redução do ferro FRAP.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que as melaninas apresentaram potencial antioxidante, com diferenças entre as linhagens e os métodos avaliados. No DPPH, destacaram-se as cepas CR11 e CR7, enquanto no FRAP a CR18 apresentou a maior capacidade de redução do ferro próxima ao controle, esses resultados indicam que as melaninas produzidas por P. *stutzeri* isoladas de somaclones de *C. peruvianus* apresentam potencial como compostos bioativos e podem ter aplicações biotecnológicas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Araucária pelo apoio e incentivo à pesquisa científica. À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela infraestrutura e suporte necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LBIOMIC) e ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, pelo suporte técnico, infraestrutura e contribuição para a realização das atividades experimentais. Agradeço também aos meus orientadores, pela orientação, dedicação, disponibilidade e pelos conhecimentos compartilhados ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

CORDERO, R. J. B.; CASADEVALI, A. Melanin. *Current Biology*, v. 30, n. 4, p. R142-R143, 2020. DOI: 10.1016/j.cub.2019.12.042.

GLAGOLEVA, A. Y.; SHOEVA, O. Y.; KHLESTKINA, E. K. Melanin pigment in plants: current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 770, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.00770.

GENG, J.; TANG, W.; WAN, X.; ZHOU, Q.; WANG, X.-J.; SHEN, P.; LEI, T.-C.; CHEN, X.-D. Photoprotection of bacterial-derived melanin against ultraviolet A-induced cell death and its potential application as an active sunscreen. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 22, n. 7, p. 852-858, 2008. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2007.02574.x.

KURIAN, N. K.; NAIR, H. P.; BHAT, S. G. Melanin producing *Pseudomonas stutzeri* BTCZ10 from marine sediment at 96 m depth (Sagar Sampada cruise #305). *International Journal of Current Biotechnology*, v. 2, n. 5, p. 6-11, 2014.

SAJJAD, W.; DIN, G.; RAFIQ, M.; IQBAL, A.; KHAN, S.; ZADA, S.; ALI, B.; KANG, S. Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles*, v. 24, n. 4, p. 447-473, 2020. DOI: 10.1007/s00792-020-01180-2.