



* B R 1 0 2 0 2 1 0 1 7 9 3 5 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021017935-0 A2

(22) Data do Depósito: 10/09/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
21/03/2023

(54) Título: PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO ASPERGILLUS NIDULANS UTILIZANDO INDUTORES DA MELANIZAÇÃO

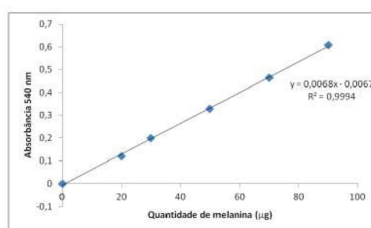
(51) Int. Cl.: C12P 1/02; C12N 1/14; C12R 1/66.

(52) CPC: C12P 1/02; C12N 1/14; C12R 2001/66.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA; SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO; WILLIAM BARTOLOMEU DE MEDEIROS.

(57) Resumo: PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans* UTILIZANDO INDUTORES DA MELANIZAÇÃO. O presente pedido de patente de invenção descreve um processo para maximizar a produção do pigmento melanina usando o mutante MEL1 do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. O método consiste em suplementar o meio de cultivo do fungo com indutores da melanização durante a etapa de cultura, em concentrações que foram determinadas por planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional. A melanina é um pigmento presente em todos os reinos, formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos por ação de polifenoloxidasas, principalmente tirosinase e lacase. Em fungos, a melanina está depositada na parede celular e confere ao fungo proteção a condições ambientais adversas. Devido as suas propriedades físico-químicas e o seu amplo espectro de atividades biológicas, a melanina apresenta potencial para ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas nas áreas da medicina, ambiental, farmacoscética e nanotecnologia. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer condições ótimas para a produção do pigmento, estudando o efeito de L-tirosina, L-DOPA, glicose, ácido glutâmico e sulfato de cobre na melanização do mutante do fungo *Aspergillus nidulans*, denominado MEL1, por meio de planejamento experimental. Com (...).



PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans* UTILIZANDO INDUTORES DA MELANIZAÇÃO

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve um processo para maximizar a produção do pigmento melanina usando o mutante MEL1 do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. O método consiste em suplementar o meio de cultivo com indutores da melanização no MEL1 na etapa de cultura, em concentrações que foram determinadas por planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O presente pedido de patente de invenção pode ser aplicado para:

- a utilização do pigmento obtido pela indústria farmacêutica para a formulação de cremes cosméticos que possam proteger a pele contra danos oxidativos e processos inflamatórios, representando uma opção mais viável do ponto de vista econômico, pois sua produção em larga escala pode ser feita a um custo menor comparado ao da melanina sintética;
- a utilização da biomassa altamente melanizada, obtida durante o cultivo do fungo, como biossorvente para a remoção e/ou recuperação de metais de alto valor agregado e tecnológico, como cobre e os terras-raras, visando o tratamento de efluentes das indústrias de mineração com um custo operacional menor do que os métodos tradicionais (por exemplo, osmose reversa) e de maneira eficiente e ambientalmente sustentável devido à baixa geração de resíduos poluentes.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] Fungos filamentosos são utilizados para a produção de uma grande diversidade de compostos que apresentam interesse comercial, tais como ácidos orgânicos, enzimas, antibióticos e pigmentos naturais (RAO *et al.*, 2017). Este último aparece como uma alternativa para substituição dos corantes sintéticos, uma vez que os pigmentos naturais são moléculas biodegradáveis e consideradas seguras para saúde humana em contraste com as propriedades mutagênicas e cancerígenas de alguns pigmentos sintéticos (ARULDASS *et al.*, 2018; DUFOSSE, 2017; LV *et al.*, 2017; NERI-

NUMA *et al.*, 2017; VENKATACHALAM *et al.*, 2018). Além disso, mais recentemente as indústrias farmacêuticas têm demonstrado grande interesse nos pigmentos naturais devido as suas possíveis atividades biológicas, tais como antitumoral, anti-inflamatório e neuroprotetora, criando assim novas demandas e aplicações para essas moléculas (NERI-NUMA *et al.*, 2017).

[004] Os fungos filamentosos destacam-se por produzirem uma extraordinária gama de pigmentos que incluem várias classes químicas, como carotenóides, azafilonas, antraquinonas, flavinas, fenazinas, quinonas e melaninas (DUFOSSE, 2017; LV *et al.*, 2017).

[005] Melanina é um pigmento escuro (variando da cor marrom ao preto), formado a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos, que pode ser encontrado em uma variedade de organismos, desde plantas e bactérias até fungos e animais. Este pigmento é conhecido como protetor a diversos estressores ambientais, tais como raios UV ou radiação ionizante, oxidantes (HClO ou H₂O₂) e metais (GEIB *et al.*, 2016; KUNWAR *et al.*, 2012; YOUNGCHIM *et al.*, 2004). Em função das propriedades físico-químicas da melanina e suas várias atividades biológicas descritas, têm crescido as aplicações biotecnológicas utilizando esse pigmento nas mais diversas áreas, tais como ambiental, médica, farmacoscsmética e nanotecnologia (FERNANDEZ; KOIDE, 2013; POMBEIRO-SPONCHIADO *et al.*, 2017).

[006] Na área ambiental, estudos demonstraram o potencial da aplicação de fungos melanizados para a remoção de radionuclídeos e metais pesados de soluções aquosas, fornecendo um meio alternativo para tratamento de efluentes industriais (SHAKYA *et al.*, 2015). Outro estudo demonstrou a importância da associação simbiótica do fungo *Cenococcum geophilum* (um ectomicorriza melanizado) com plantas para a tolerância à dessecação de cultivos de interesse comercial, podendo ser uma nova estratégia de estudo para plantios em ambientes com pouca disponibilidade de água (FERNANDEZ; KOIDE, 2013).

[007] Em relação a área médica, Zhang *et al.* (2015) demonstraram que nanopartículas de melanina podem entrar com sucesso em tumores e atuar como um eficiente sistema de administração de medicamentos para tratamentos de tumores, aumentando assim a

utilização segura dos medicamentos para o tratamento e diminuindo significativamente a dosagem utilizada e seus efeitos colaterais. A melanina também pode ser usada em nanotecnologia como um biomaterial semiconductor biodegradável, como demonstrado em estudo realizado por Bettinger *et al.* (2009).

[008] O grupo de pesquisa, inventor desse pedido de patente de invenção tem estudado uma linhagem mutante (denominada MEL1) do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*, que apresenta produção aumentada de melanina (POMBEIRO, 1991). O grupo demonstrou que a melanina produzida pelo MEL1 exerce atividades antioxidante e anti-inflamatória. Também foi demonstrado que a melanina produzida pelo MEL1 não apresenta efeito citotóxico e mutagênico, evidenciando o potencial biotecnológico deste pigmento principalmente na área farmacêutica e cosmética (GONÇALVES *et al.*, 2012; GONÇALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2013). Neste contexto, estudos que demonstrem a viabilidade da produção da melanina produzida pelo mutante MEL1 são necessários para uma futura aplicação prática.

[009] De acordo com a literatura, ainda não há um método economicamente viável para a produção natural de melanina, visando atender a sua possível demanda em aplicações biotecnológicas. Sun *et al.* (2016) argumentam que a produtividade de um bioprocessamento depende das condições de cultivo, as quais afetam não somente o crescimento celular como também a produção de metabólitos de interesse. Neste sentido, vários fatores, como tipo e concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura, velocidade de agitação, influenciam a produção de pigmentos porque promovem alterações metabólicas durante o crescimento do fungo. Com essa premissa, o grupo estudou a influência das condições de cultivo do MEL1 na produção de melanina e estabeleceu uma condição otimizada (pré cultura: 10^6 conídios.mL⁻¹; pH 6,8; 29°C; 1% água de maceração de milho (AMM) (v/v) e cultura: 10% do pré-inóculo; 0,2% AMM (v/v); 0,2% Tween 80 (v/v); 225 rpm) que levou ao aumento de 430% na produção de melanina pelo MEL1 em comparação a condição antes da otimização (pré-cultura: 105 conídios.mL⁻¹; pH 6,8; 37°C; 1% AMM (v/v) e cultura: 20% do pré-inóculo; 0,2% AMM (v/v); sem Tween 80 e 200 rpm) (SOUSA,

2017). Tendo em vista que a biossíntese da melanina é resultado da polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos pela ação das polifenoloxidasas, determinar os possíveis indutores dessas enzimas pode promover uma maior melanização da biomassa do fungo. Na biossíntese de melanina em fungos, a lacase e tirosinase são as principais enzimas responsáveis pela polimerização deste pigmento. Íons de cobre podem atuar com indutores destas enzimas, devido ao fato de que o cobre atua como cofator enzimático no sítio catalítico de lacases (BALDRIAN, 2006) e tirosinases (RAMSDEN; RILEY, 2014).

[010] A presença dos substratos (L-tirosina e L-DOPA) das respectivas enzimas tem sido referenciada como indutores da melanização (GASPARETTI *et al.*, 2012). Um estudo demonstrou que a L-tirosina aumentou a atividade de tirosinase em *Auricularia auricula*, resultando em maior produção de melanina (ZOU *et al.*, 2016) busca por anterioridades e invenções relacionadas descreve alguns processos de produção de melanina.

[011] O documento BR102018007952-2A2 descreve um processo de cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* (do mutante MEL1) que promoveu uma maior produção do pigmento melanina. Este processo foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa e estabeleceu condições de cultivo que a presente invenção fez uso como condição controle.

[012] O documento BR102013001441-9A2 descreve um processo de produção de melanina sintética a partir da oxidação do precursor da melanina L-DOPA.

[013] O documento WO2010064262A2 apresenta um processo de produção de melanina solúvel em água.

[014] O documento CN104357484A descreve um meio de cultivo para produção de melanina em cultura submersa.

[015] O documento US5814495A também descreve processo de produção de melanina por manipulação dos constituintes do meio e condições de cultivo. No entanto, nenhuma das invenções anteriores relata o uso de indutores da melanização na composição do meio de cultura.

[016] Neste sentido, a presente invenção estudou o efeito de L-tirosina, L-DOPA, sulfato de cobre, glicose e ácido glutâmico na melanização do mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* e por meio de um planejamento experimental determinou condições ótimas de cultivo para maximização da produção de melanina pelo MEL1 que resultou em aumento de 640% na produção de melanina em comparação com a técnica descrita pelo documento BR102018007952-2A2.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[017] É um dos objetivos da presente invenção um processo de produção de melanina por fonte natural que consiste em suplementar meio de cultivo com indutores da melanização do fungo *Aspergillus nidulans* (mutante MEL1).

[018] É um dos objetivos da presente invenção um processo de produção de melanina por fonte natural que estabelece meio de cultivo definido com suplementação do meio com indutores da melanização com suas concentrações ótimas que resulta na maximização da produção de melanina pelo MEL1.

[019] É um dos objetivos da presente invenção um processo de produção de melanina por fonte natural que maximiza a produção de melanina pelo MEL1, sendo o aumento da produção de 640% em comparação com a condição de cultivo controle (sem a suplementação dos indutores). Com isso, fornecer uma metodologia para produção do pigmento melanina por fonte natural e com alta produtividade visando sua produção em larga escala.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[020] A presente tecnologia apresenta vantagens, comparada com as tecnologias encontradas. Atualmente no mercado porque possibilita a produção do pigmento melanina por fonte natural e com alta produtividade. Além disso, o pigmento melanina produzido por esta tecnologia apresenta atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, enquanto pigmentos produzidos por reações químicas (artificiais), tecnologias atuais, apresentam efeitos potencialmente prejudiciais à saúde humana.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO E DAS FIGURAS

[021] Para obter a condição ótima do cultivo suplementado com os indutores da melanização do MEL1 foi seguido a seguinte metodologia:

CRESCIMENTO DA LINHAGEM

[022] Foi utilizado meio mínimo descrito por Cove (1996), com seguinte composição: 10 mL de solução de sais, 1 mL de solução de elementos traços e o volume completado até 1000 mL água destilada. Após autoclavagem, a 121,1 °C (1 kgf/cm²) por 20 minutos, foram adicionados de forma asséptica ao meio as fontes de carbono (glicose 55 mmol.L⁻¹), nitrogênio (nitrato de sódio 70 mmol.L⁻¹) e o requerimento nutricional (inositol 20 mg.L⁻¹). Para a preparação do meio solidificado foi adicionado 1,5% (v/v) de ágar antes da autoclavagem. [023] A solução de sais e a solução de elementos traços apresentam a seguinte composição:

- Solução de sais (COVE, 1966):
 - Fosfato de potássio monobásico – 14,0 g
 - Fosfato de potássio bibásico – 6,86 g
 - Cloreto de potássio – 1,0 g
 - Sulfato de magnésio – 1,0 g
 - Água destilada até completar 100 mL

- Solução de elementos traços (COVE, 1966):
 - Borato de sódio – 40 mg
 - Sulfato de cobre – 400 mg
 - Sulfato de ferro – 532 mg
 - Molibdato de sódio – 800 mg
 - Sulfato de zinco – 8 mg
 - Água destilada até completar 100 mL

[024] Após o crescimento da linhagem MEL1 em meio mínimo solidificado por cinco dias a 37°C, foi realizada a coleta dos conídios em solução de NaCl 0,85% (m/v). Em

seguida, o número de conídios por mililitro foi estimado por meio de contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio. A partir deste método, foi determinado o volume necessário de inóculo para obter a concentração final de 10^6 conídios.mL⁻¹ de meio.

[025] O cultivo foi realizado em duas etapas: pré cultura e cultura.

[026] A etapa da pré-cultura foi realizada em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio mínimo descrito e suplementado com glicose (55 mmol.L⁻¹), nitrato de sódio (70 mmol.L⁻¹), inositol (20 mg.L⁻¹) e 1% (v/v) de água de maceração de milho (AMM). Esse subproduto obtido da moagem do milho foi adicionado ao meio por apresentar uma composição rica em nutrientes, principalmente fontes de carbono, nitrogênio e minerais, favorecendo um maior crescimento do fungo (PANESAR et al., 2015). Em seguida, os frascos contendo esse meio foram inoculados com 10^6 conídios.mL⁻¹ de meio e mantidos sob agitação constante de 225 rpm à 29 °C por 48h. Após o crescimento, a biomassa foi coletada por centrifugação para ser usada como inóculo na etapa de cultura.

[027] A etapa da cultura foi realizada em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio mínimo descrito e suplementado com nitrato de sódio (70 mmol.L⁻¹), inositol (20 mg.L⁻¹), 0,2% (v/v) de solução Tween 80 e suplementado com as substâncias (possíveis indutores da melanização) avaliadas no planejamento experimental (descrito abaixo). Após inoculação utilizando 10% da massa micelial, obtida na pré cultura, os frascos foram mantidos sob agitação constante de 225 rpm à 29 °C por 72h. Após este período, a biomassa foi separada do meio de cultivo por filtração a vácuo, e seca em estufa a 60°C, até atingir peso constante. A biomassa seca foi utilizada para extração e quantificação da melanina. Como condição controle (antes da otimização) foi realizado o cultivo do MEL1 nas mesmas condições descritas acima, exceto que na etapa de cultura foi adicionado glicose (55 mmol.L⁻¹), 0,2% (v/v) de AMM e nenhuma das substâncias avaliadas no planejamento experimental.

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

[028] Foi elaborado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar o grau da melanização do MEL1 em resposta a

cinco fatores: L-tirosina, glicose, ácido glutâmico, L-DOPA e sulfato de cobre. Os níveis selecionados para o DCCR para cada fator foram estabelecidos em função de resultados obtidos anteriormente e estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis de cada fator (variável independente) estudado para a resposta produção de melanina (mg.g-1) pelo mutante MEL1.

Fatores	Níveis dos fatores				
	-2,378	-1	0	1	2,378
L-tirosina (mmol.L ⁻¹)	0,02	1,40	2,40	3,40	4,78
Glicose % (v/v)	0,11	0,80	1,30	1,80	2,49
Ác. Glutâmico (mmol.L ⁻¹)	0,74	3,50	5,50	7,50	10,26
L-Dopa (mmol.L ⁻¹)	0,02	1,40	2,40	3,40	6,85
Sulfato de cobre (µmol.L ⁻¹)	0,27	7,50	12,75	18,00	25,23

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO PIGMENTO MELANINA

[029] A extração do pigmento melanina presente na biomassa foi feita seguindo o método descrito por Sava *et al.* (2001), com algumas modificações. Em tubos falcon de 50 mL contendo a biomassa pulverizada em almofariz, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol.L⁻¹, na proporção 1:30 (m/v), seguida de autoclavagem a 121 °C (1kgf/cm²) por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante contendo o pigmento solubilizado foi separado da biomassa por centrifugação a 2576 xg por 15 minutos. Este procedimento foi repetido várias vezes até a completa descoloração da biomassa. Posteriormente, o sobrenadante contendo o pigmento solubilizado foi acidificado com ácido clorídrico (HCl) concentrado até pH 2, deixado em repouso por 72h e, em seguida, fervido por 10 minutos. Este procedimento visa promover a precipitação do pigmento melanina devido a propriedade da melanina ser insolúvel em pH ácido. Em seguida, a suspensão ácida contendo o pigmento precipitado foi separada por centrifugação a 2575 xg por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o

precipitado ressuspendido em água destilada. Foram realizadas lavagens do pigmento em água destilada seguida de centrifugação a 2576 xg por 15 minutos. A etapa de lavagem do precipitado (contendo o pigmento) em água destilada foi realizado até neutralizar pH. O pigmento obtido foi colocado na estufa a 60 °C por 24h para secagem.

[030] Para quantificar a melanina presente no pigmento extraído da biomassa foi utilizada a metodologia descrita por Bull (1970). A amostra foi preparada na concentração de 1 mg de pigmento.mL⁻¹ de NaOH 0,5 mol.L⁻¹ e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro usando o comprimento de onda de 540 nm. A concentração da melanina foi determinada a partir do coeficiente de absorvidade obtido da curva analítica da DOPA melanina sintética (Sigma- Aldrich), usada como padrão (Figura 1).

[031] O efeito de cada fator na variável resposta pode ser observado na Tabela 2. Dentre os fatores com efeitos significativos ($p < 0,05$) para a produção de melanina, L-DOPA foi o único que apresentou efeito positivo. Neste sentido, variando a concentração de L-DOPA do nível inferior -1 (1,4 mmol.L⁻¹) para o nível superior +1 (3,4 mmol.L⁻¹) resulta em um aumento na produção de melanina na ordem de 36,31 mg de melanina.g⁻¹ de biomassa (Tabela 2). Por outro lado, todos os outros fatores apresentaram efeitos negativos na produção de melanina.

[032] Com os resultados do DCCR foi possível determinar os coeficientes de regressão para a resposta produção de melanina (mg de melanina.g⁻¹ de biomassa), levando a proposição de um modelo matemático, representado pela equação Y:

Tabela 2 - Efeito dos fatores na produção de melanina (mg.g⁻¹).

Fatores*	Efeito	Erro padrão	t (25)	p-valor**
Média	82,2567	3,680960	22,34655	0,000196
(1) L-Tirosina (L)	-1,7797	2,465089	-0,72201	0,522478
L-Tirosina (Q)	-10,8821	2,427276	-4,48322	0,020697
(2) Glicose (L)	-22,1140	2,465089	-8,97091	0,002923
Glicose (Q)	-6,0661	2,427276	-2,49916	0,087772
(3) Ác. Glutâmico (L)	1,4035	2,465089	0,56931	0,608983
Ác. Glutâmico (Q)	-11,3742	2,427276	-4,68607	0,018368
(4) L-DOPA (L)	36,3164	2,472834	14,68617	0,000685
L-DOPA (Q)	-7,9652	1,047696	-7,60252	0,004723
(5) Sulfato de cobre (L)	-10,2318	2,465863	-4,14933	0,025435
Sulfato de cobre (Q)	-8,2486	2,432870	-3,39049	0,042759
1L by 2L	1,2977	2,868442	0,22094	0,826934
1L by 3L	7,3114	2,868442	1,24483	0,224737
1L by 4L	-8,0771	2,868442	-1,37519	0,181272
1L by 5L	10,1649	2,868442	3,54378	0,038260
2L by 3L	8,3747	2,868442	1,42587	0,166275
2L by 4L	5,1838	2,868442	0,88259	0,385866
2L by 5L	-7,5731	2,868442	-1,28939	0,209066
3L by 4L	4,3036	2,868442	0,73272	0,470544
3L by 5L	-10,9160	2,868442	-3,80555	0,031884
4L by 5L	-12,2908	2,868442	-2,09261	0,046696

* L para termos lineares e Q para termos quadráticos; **Nível de significância 95% ($p < 0,05$).

$$Y = -63,40 + 10,84x_1 - 5,45x_1^2 - 10,77x_2 - 12,14x_2^2 + 10,21x_3 - 1,43x_3^2 + 49,24x_4 - 3,99x_4^2 + 8,10x_5 - 0,15x_5^2 + 1,3x_1x_2 + 1,83x_1x_3 - 4,04x_1x_4 + 5,2x_2x_4 - 1,45x_2x_5 + 1,08x_3x_4 - 0,52x_3x_5 - 1,2x_4x_5$$

Onde: x_1 = L-tirosina

x_2 = Glicose

x_3 = Ácido glutâmico

x_4 = L-DOPA

x_5 = Sulfato de cobre

[033] Pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 3, observa-se que o modelo proposto que descreve a resposta de Y em função dos fatores estudados é adequado, visto que F calculado foi significativo ($p < 0,05$). Desta forma, o modelo matemático representa nossos dados e, de acordo com Rodrigues e lemma (2005), satisfaz os requisitos para a construção das superfícies respostas e curvas de contorno. Além disso, pela análise de distribuição F, verifica-se que a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$), ou seja, o modelo não apresenta falta de ajuste.

Tabela 3 - Análise de variância para regressão dos fatores em função da produção de melanina (mg.g^{-1} biomassa) pelo MEL1 – *Aspergillus nidulans*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calc	F critico	p-valor'
Regressão	27195,818	20	1359,79092	4,93	2,01	0,000127
Resíduos	6899,4605	25	275,978418			
Falta de ajuste	6701,99	22	304,635714	4,63	8,66	0,11582
Erro puro	197,47	3	65,8249178			
Total	34095,28	45				

$R^2 = 79,76\%$

*Nível de significância 95% ($p < 0,05$).

[034] Validado o modelo matemático, foram construídas as superfícies de respostas (Figura 2). Em todos os gráficos foi considerada como resposta a produção de melanina (mg.g^{-1} biomassa) em função das concentrações de L-DOPA versus os

outros fatores. A escolha de L-DOPA foi devido ao fato desta substância ter apresentado maior efeito significativo para a resposta produção de melanina.

[035] A Figura 2 apresenta as curvas superfícies de respostas para a produção de melanina (mg.g^{-1} biomassa) pelo mutante MEL1 em função dos fatores: a) L-DOPA versus ácido glutâmico; b) L-DOPA versus Glicose; c) L-DOPA versus Sulfato de cobre e d) L-DOPA versus L-tirosina.

[036] Pela análise das superfícies de respostas (Figura 2) é possível observar que a maior produção de melanina ocorreu sempre nas maiores concentrações de L-DOPA, independentemente da combinação com os outros fatores. Estes resultados indicam que o L-DOPA tem um papel de indutor da melanização para a linhagem MEL1, provavelmente devido ao fato de a melanina produzida por este mutante ter sido caracterizada como DOPA-melanina (GONÇALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2012). Neste sentido, suplementar o meio de cultivo do MEL1 com L-DOPA forneceu o substrato para biossíntese da DOPA-melanina neste fungo. A síntese deste pigmento ocorre por oxidação do L-DOPA, pela ação das enzimas tirosinase ou lacase, diretamente a dopaquinona, a qual é polimerizada espontaneamente para formar DOPA-melanina (LANGFELDER *et al.*, 2003).

[037] Outros estudos também relataram o efeito do L-DOPA na produção do pigmento melanina, Almeida-Paes *et al.* (2009) demonstraram que algumas linhagens de *Sporothrix schenckii* foram incapazes de apresentar melanização na ausência de L-DOPA, demonstrando a importância de L-DOPA na biossíntese da melanina nas linhagens estudadas. Eisenman *et al.* (2011) também observaram o efeito positivo de L-DOPA na melanização de *Cryptococcus neoformans*. Os autores demonstraram que para melanização em *C. neoformans* ocorrer requer a adição exógena de substrato para biossíntese da melanina, sendo L-DOPA o substrato preferencial. Outro precursor da via de biossíntese da melanina frequentemente reportado como indutor da melanização em diversos fungos é a L-tirosina (GASPARETTI *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2016). Sun *et al.* (2016) relataram que a produção de melanina por *Auricularia auricula* exibiu uma correlação positiva na concentração de L-tirosina no meio de cultivo e a produção de melanina.

[038] Outro estudo também demonstrou que a produção de melanina por *A. auricula* é aumentada com a suplementação do meio de cultivo com L-tirosina (ZOU *et al.*, 2016). No entanto, com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível verificar que L-tirosina é requerida em baixas concentrações quando em combinação com L-DOPA (Figura 2d). Uma possível explicação deve-se ao fato de que quando L-tirosina e L-DOPA (precursores da melanina) estão disponíveis para biossíntese do pigmento, o mutante MEL1 utiliza preferencialmente o L-DOPA para biossíntese da melanina, ou seja, L-DOPA pode ser considerado o precursor preferencial para produção de melanina pelo mutante MEL1 em comparação com L-tirosina. Na interação de L-DOPA com glicose, observa-se que a maior produção de melanina em alta concentração de L-DOPA somente ocorreu quando glicose também estava presente em altas concentrações (Figura 2b). De acordo com a literatura, a fonte de carbono e sua concentração no meio de cultivo podem afetar diretamente a biossíntese de metabólitos secundários em fungos (GRIFFIN, 1993), incluindo a produção de melanina. Por exemplo, Sun *et al.* (2016), estudando o efeito de nutrientes no meio de cultivo para melanização em *A. auricula*, reportou que a concentração de glicose afeta tanto o crescimento micelial quanto a síntese de melanina, pois fornece carbono não só para as necessidades energéticas de manutenção das atividades celulares como também para biossíntese de melanina em *A. auricula*. Neste sentido, os resultados da Figura 2b também podem ser explicados pelo fato que a maior produção de melanina obtida na presença de altas concentrações de L-DOPA requer muita energia química, a qual é fornecida quando a glicose está presente em altas concentrações. O mesmo pode ser observado para interação de ácido glutâmico e L-DOPA. Na Figura 2a, verifica-se que ácido glutâmico também deve estar presente em altas concentrações para obter uma maior produção de melanina em altas concentrações de L-DOPA. A presença do ácido glutâmico no meio de cultivo pode representar uma vantagem energética, pois o glutamato pode ser diretamente utilizado para biossíntese de vários metabólitos sem a necessidade de sua síntese a partir de amônia ou nitrato (SAID *et al.*, 2014).

[039] De acordo com a Figura 2C, a maior produção de melanina obtida em altas concentrações de L-DOPA requer baixa concentração de sulfato de cobre. Embora o sulfato de cobre seja amplamente conhecido como indutor da tirosinase e lacase, enzimas responsáveis pela melanização em fungos (LANGFELDER *et al.*, 2003) e estudos demonstrarem que a melanização de *Trametes pubescens* ocorre em resposta a concentrações crescentes de íon de cobre (GALHAUP; HALTRICH, 2001), os resultados do presente estudo indicam que a presença de sulfato de cobre no meio de cultivo não influencia positivamente a melanização do MEL1 e é requerido em baixas concentrações.

OTIMIZAÇÃO DOS FATORES (INDUTORES)

[040] Foi utilizado a função de desejabilidade, a qual calcula o valor máximo para a variável resposta em função da combinação dos fatores em seus níveis ótimos. A Figura 3 apresenta a função de desejabilidade para a variável resposta produção de melanina em função da combinação dos valores ótimos de cada fator.

[041] Como observa-se na Figura 3, o valor predito pelo modelo para maior produção de melanina é de 143,02 mg de melanina.g⁻¹ de biomassa. Por meio desta função, também é possível estabelecer o melhor nível de cada fator visando menor custo no processo. Por exemplo, o fator L-tirosina foi estabelecido pela função de desejabilidade em seu nível central (2,4 mmol.L⁻¹), entretanto, observando o fator L-tirosina (Figura 3), verifica-se que é possível optar por utilizar a menor concentração de L-tirosina (0,02 mmol.L⁻¹) sem afetar de forma significativa o valor predito pelo modelo. Desta forma, com o objetivo de reduzir os custos do processo, estabeleceu-se as seguintes concentrações para cada fator para validação experimental do modelo: L-tirosina 0,02 mmol.L⁻¹ ; Glicose 1,8% (v/v); Ácido glutâmico 10,26 mmol.L⁻¹; L-DOPA 6,85 mmol.L⁻¹ e Sulfato de cobre 0,27 µmol.L⁻¹.

[042] Na tabela 4 verifica-se que a produção de melanina obtida no ensaio de validação, utilizando as condições estabelecidas, foi de 145,11 ± 11,24 mg.g⁻¹ de biomassa, sendo a diferença de apenas 1,44% comparado com o valor predito pelo modelo (143,02 mg de melanina.g⁻¹ de biomassa), indicando que não há diferença

estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores obtido e predito pelo modelo, portanto, o modelo proposto foi validado experimentalmente.

Tabela 4 - Produção de melanina pelo MEL1 na condição otimizada para validação do modelo proposto.

	Melanina (mg.g ⁻¹)
Predito pelo modelo	143,02
Obtido experimentalmente	145,11 ± 11,24

[043] Uma vez estabelecida as condições ótimas para produção da melanina pelo mutante MEL1 é possível compará-la com a condição antes da otimização (controle). A Figura 4 apresenta a melanização da biomassa do MEL1 nas condições controle (A) e otimizada (B). Na condição controle, a produção de melanina foi de $19,69 \pm 3,16$, enquanto que, após a otimização, atingiu valores de $145,11 \pm 11,24$ mg de melanina por grama de biomassa. Essa diferença de melanização do MEL1 pode ser observada na Figura 4. Portanto, com a otimização dos fatores analisados (L-Dopa, L-tirosina, ácido glutâmico, glicose e sulfato de cobre) foi obtido um aumento de aproximadamente 640% na produção de melanina pelo mutante MEL1.

[044] Desta forma, os resultados obtidos neste estudo maximizaram a produção de melanina pelo mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans*, estabelecendo o meio de cultivo para etapa de cultura com a seguinte composição: meio mínimo conforme descrito, adicionado inositol (20 mg.L^{-1}), nitrato de sódio (70 mmol.L^{-1}) e Tween 80 (0,2% - v/v) e suplementado com L-tirosina $0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$; Glicose 1,8% (v/v); Ácido glutâmico $10,26 \text{ mmol.L}^{-1}$; L-DOPA $6,85 \text{ mmol.L}^{-1}$ e Sulfato de cobre $0,27 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. Em seguida o meio de cultivo é inoculado com 10% da biomassa obtida na etapa de pré-cultura e mantido sob agitação constante de 225 rpm à 29 °C por 72h. Após este período, a biomassa é separada do meio de cultivo por filtração à vácuo e seca em estufa a 60 °C até atingir peso constante. A biomassa seca é utilizada para extração e quantificação da melanina.

REIVINDICAÇÃO

1. PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans* UTILIZANDO INDUTORES DA MELANIZAÇÃO

o dito processo de maximização **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

Etapa 1: Para o crescimento da linhagem MEL1 foi utilizado meio mínimo descrito por Cove (1996), com seguinte composição: 10 mL de solução de sais, 1 mL de solução de elementos traços e o volume completado até 1000 mL água destilada; após autoclavagem, a 121,1 °C (1 kgf/cm²) por 20 minutos, foram adicionados de forma asséptica ao meio as fontes de carbono (glicose 55 mmol.L⁻¹), nitrogênio (nitrato de sódio 70 mmol.L⁻¹) e o requerimento nutricional (inositol 20 mg.L⁻¹); para a preparação do meio solidificado foi adicionado 1,5% (v/v) de ágar antes da autoclavagem; em que a solução de sais e a solução de elementos traços apresentam a seguinte composição:

- Solução de sais (COVE, 1966):

- Fosfato de potássio monobásico – 14,0 g
- Fosfato de potássio bibásico – 6,86 g
- Cloreto de potássio – 1,0 g
- Sulfato de magnésio – 1,0 g
- Água destilada até completar 100 mL

- Solução de elementos traços (COVE, 1966):

- Borato de sódio – 40 mg
- Sulfato de cobre – 400 mg
- Sulfato de ferro - 532 mg
- Molibdato de sódio – 800 mg
- Sulfato de zinco – 8mg
- Água destilada até completar 100 mL

Etapa 2: Após o crescimento da linhagem MEL1 em meio mínimo solidificado por cinco dias a 37°C, foi realizada a coleta dos conídios em solução de NaCl 0,85% (m/v); em seguida, o número de conídios por mililitro foi estimado por meio de contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio; a partir deste método, foi

determinado o volume necessário de inóculo para obter a concentração final de 10^6 conídios.mL⁻¹ de meio;

Etapa 3: O cultivo foi realizado em duas etapas: pré cultura e cultura; em que a etapa da pré-cultura foi realizada em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio mínimo descrito e suplementado com glicose (55 mmol.L^{-1}), nitrato de sódio (70 mmol.L^{-1}), inositol (20 mg.L^{-1}) e 1% (v/v) de água de maceração de milho (AMM); esse subproduto obtido da moagem do milho foi adicionado ao meio por apresentar uma composição rica em nutrientes, principalmente fontes de carbono, nitrogênio e minerais, favorecendo um maior crescimento do fungo (PANESAR et al., 2015); em seguida, os frascos contendo esse meio foram inoculados com 10^6 conídios.mL⁻¹ de meio e mantidos sob agitação constante de 225 rpm à 29 °C por 48h; após o crescimento, a biomassa foi coletada assepticamente por centrifugação para ser usada como inóculo na etapa de cultura; a etapa da cultura foi realizada em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio mínimo descrito e suplementado com nitrato de sódio (70 mmol.L^{-1}), inositol (20 mg.L^{-1}), 0,2% (v/v) de solução Tween 80 e suplementado com as substâncias (possíveis indutores da melanização) que foram avaliadas no planejamento experimental; após inoculação utilizando 10% da massa micelial, obtida na pré cultura, os frascos foram mantidos sob agitação constante de 225 rpm à 29 °C por 72h.; após este período, a biomassa foi separada do meio de cultivo por filtração a vácuo, e seca em estufa a 60 °C, até atingir peso constante; a biomassa seca foi utilizada para extração e quantificação da melanina; como condição controle (antes da otimização) foi realizado o cultivo do MEL1 nas mesmas condições descritas acima, exceto que na etapa de cultura foi adicionado glicose (55 mmol.L^{-1}), 0,2% (v/v) de AMM e nenhuma das substâncias avaliadas no planejamento experimental;

Etapa 4 - Planejamento Fatorial: foi elaborado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar o grau da melanização do MEL1 em resposta a cinco fatores: L-tirosina, glicose, ácido glutâmico, L-DOPA e sulfato de cobre; em que os níveis selecionados para o DCCR para cada fator foram estabelecidos em função de resultados obtidos anteriormente e são representados:

Fatores	Níveis dos fatores				
	-2,378	-1	0	1	2,378
L-tirosina (mmol.L ⁻¹)	0,02	1,40	2,40	3,40	4,78
Glicose % (v/v)	0,11	0,80	1,30	1,80	2,49
Ác. Glutâmico (mmol.L ⁻¹)	0,74	3,50	5,50	7,50	10,26
L-Dopa (mmol.L ⁻¹)	0,02	1,40	2,40	3,40	6,85
Sulfato de cobre (µmol.L ⁻¹)	0,27	7,50	12,75	18,00	25,23

Etapa 5 - Extração e quantificação do pigmento melanina - A extração do pigmento melanina presente na biomassa foi feita seguindo o método descrito por Sava *et al.* (2001), com algumas modificações; em tubos falcon de 50 mL contendo a biomassa pulverizada em almofariz, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol.L⁻¹, na proporção 1:30 (m/v), seguida de autoclavagem a 121 °C (1kgf/cm²) por 10 minutos; em seguida, o sobrenadante contendo o pigmento solubilizado foi separado da biomassa por centrifugação a 2576 xg por 15 minutos; este procedimento foi repetido várias vezes até a completa descoloração da biomassa; em que posteriormente, o sobrenadante contendo o pigmento solubilizado foi acidificado com ácido clorídrico (HCl) concentrado até pH 2, deixado em repouso por 72h e, em seguida, fervido por 10 minutos; este procedimento visa promover a precipitação do pigmento melanina devido a propriedade da melanina ser insolúvel em pH ácido; em seguida, a suspensão ácida contendo o pigmento precipitado foi separada por centrifugação a 2575 xg por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em água destilada; foram realizadas lavagens do pigmento em água destilada seguida de centrifugação a 2576 xg por 15 minutos; a etapa de lavagem do precipitado (contendo o pigmento) em água destilada foi realizado até neutralizar pH; o pigmento obtido foi colocado na estufa a 60 °C por 24h para secagem;

Etapa 6 – Para a otimização dos fatores (possíveis indutores) foi utilizado a função de desejabilidade, a qual calcula o valor máximo para a variável resposta em função da combinação dos fatores em seus níveis ótimos.

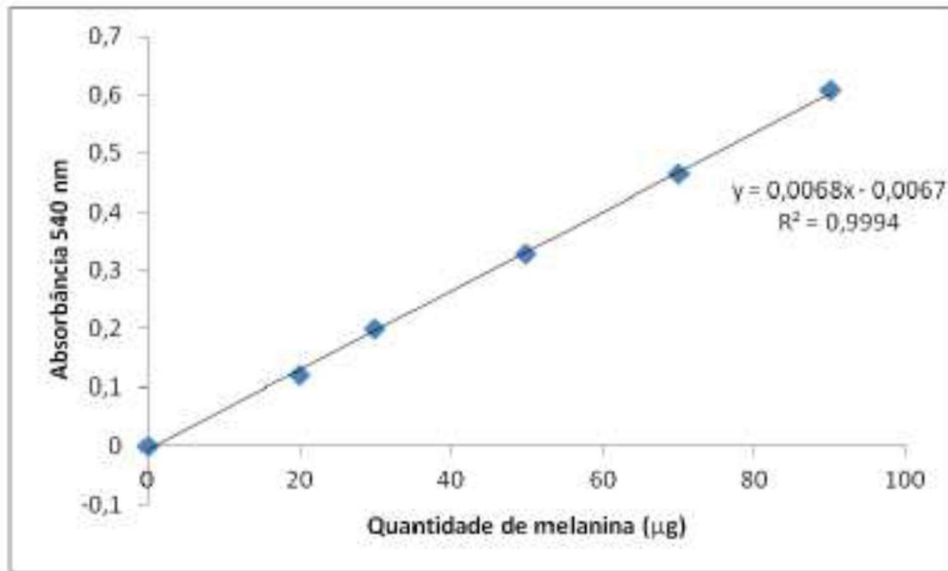


FIGURA 1

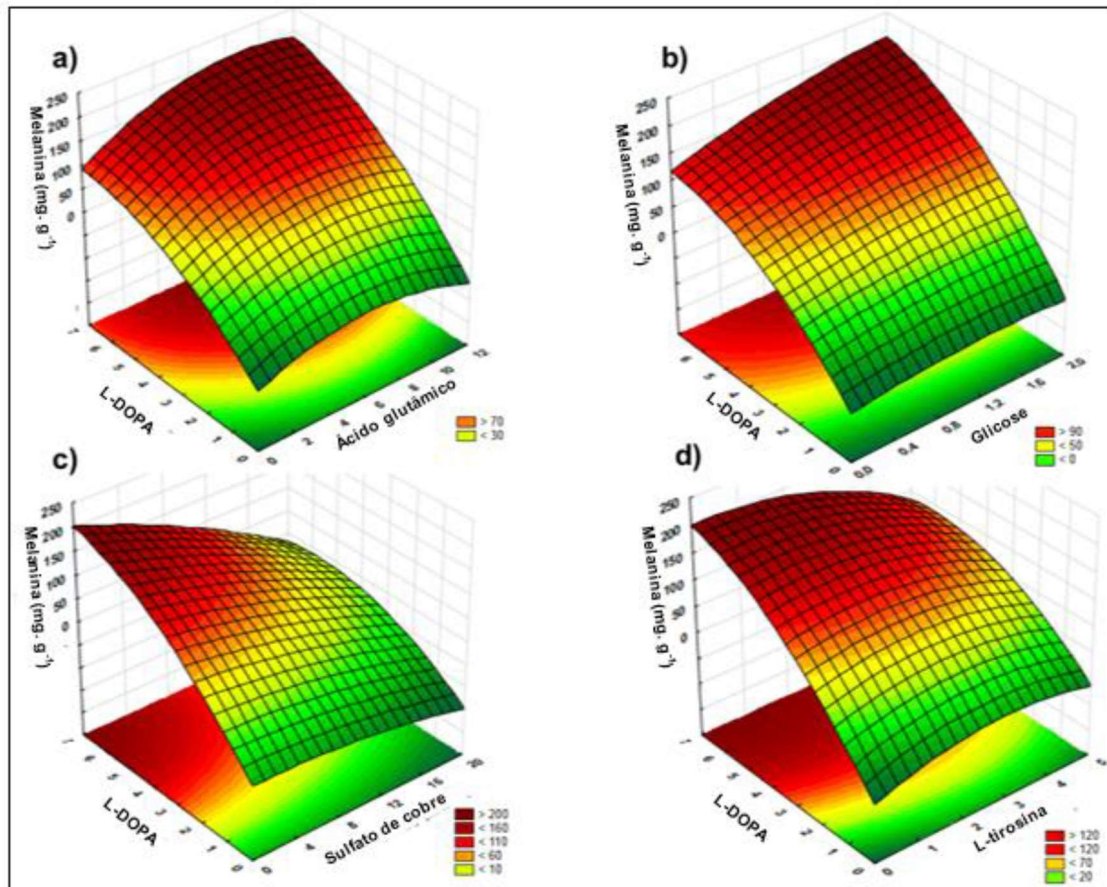


FIGURA 2

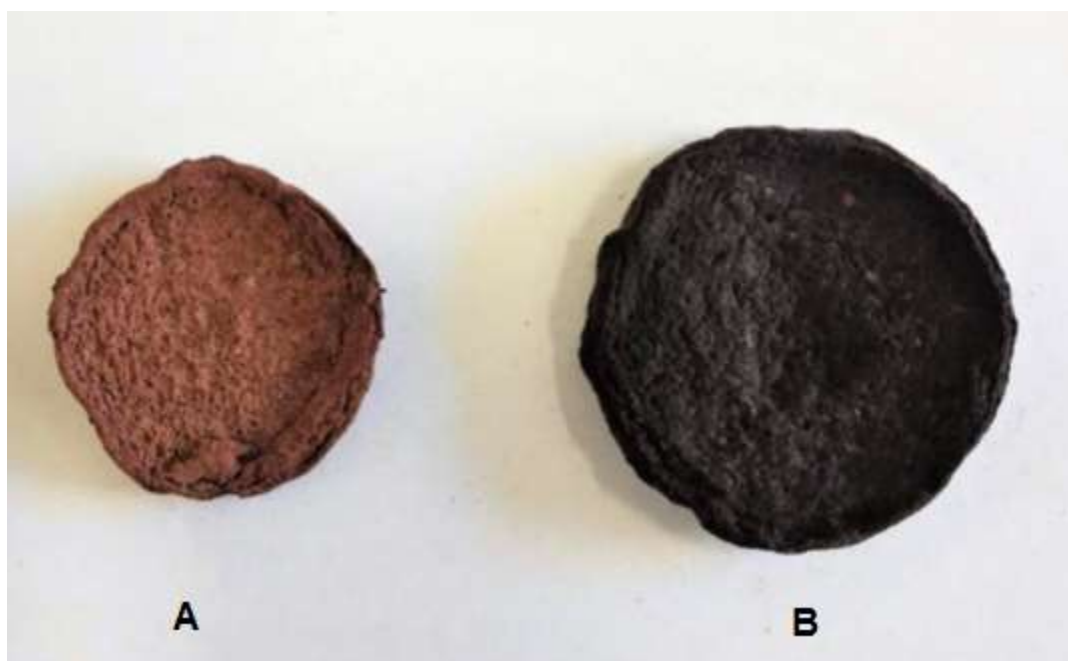


FIGURA 4

RESUMO

PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans* UTILIZANDO INDUTORES DA MELANIZAÇÃO

O presente pedido de patente de invenção descreve um processo para maximizar a produção do pigmento melanina usando o mutante MEL1 do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. O método consiste em suplementar o meio de cultivo do fungo com indutores da melanização durante a etapa de cultura, em concentrações que foram determinadas por planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional. A melanina é um pigmento presente em todos os reinos, formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos por ação de polifenoxidases, principalmente tirosinase e lacase. Em fungos, a melanina está depositada na parede celular e confere ao fungo proteção a condições ambientais adversas. Devido as suas propriedades físico-químicas e o seu amplo espectro de atividades biológicas, a melanina apresenta potencial para ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas nas áreas da medicina, ambiental, farmacoscsmética e nanotecnologia. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer condições ótimas para a produção do pigmento, estudando o efeito de L-tirosina, L-DOPA, glicose, ácido glutâmico e sulfato de cobre na melanização do mutante do fungo *Aspergillus nidulans*, denominado MEL1, por meio de planejamento experimental. Com os resultados obtidos no planejamento experimental foi possível estabelecer as condições ótimas da cultura que resultou em um aumento de 640% na produção de melanina pelo MEL1 em comparação a condição controle (antes da otimização).