UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Instituto de Química

ESTUDO DA ESTRUTURA E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PIGMENTO MELANINA PRODUZIDO PELO FUNGO Aspergillus nidulans

Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves

Araraquara

2008

RITA DE CÁSSIA RIBEIRO GONÇALVES

ESTUDO DA ESTRUTURA E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PIGMENTO MELANINA PRODUZIDO PELO FUNGO *Aspergillus nidulans*

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, com parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado

Araraquara

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Gonçalves, Rita de Cássia Ribeiro
G635e Estudo da estrutura e da atividade biológica do pigmento melanina produzido pelo fungo *Aspergillus nidulans* / Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves. – Araraquara : [s.n], 2008
151 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado

1. Bioquímica. 2. Melanina . 3. Fungo. 4. Atividade biológica. 5. Estrutura. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

RITA DE CÁSSIA RIBEIRO GONÇALVES

Estudo da estrutura e da atividade biológica do pigmento melanina produzido pelo fungo *Aspergillus nidulans*

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, com parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Araraquara, 24 de setembro de 2008

BANCA EXAMINADORA

_____
Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

_____
Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach Machado
Instituto de Ciências Biológicas – UNICAMP, Campinas

_____
Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto

_____
Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes
Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru

_____
Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara

RITA DE CÁSSIA RIBEIRO GONÇALVES

1. Dados pessoais

1.1. Nascimento: 30/04/1976

1.2. Naturalidade: Porecatu - PR

1.3. Estado civil: solteira

1.4. Filiação: Deusani Ribeiro

Adauto Gonçalves

1.5. Documento de Identidade: 27146377-6

1.6. Cadastro de Pessoa Física: 242122678-42

2. Formação Acadêmica

2.1. Farmacêutica Bioquímica, curso de Farmácia-Bioquímica, concluído em dezembro de 1999, na Universidade Estadual de Maringá.

2.2. Mestrado em Biotecnologia, curso de Pós-graduação em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia, concluído dia 09/12/2002 no Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Título da dissertação: Purificação e caracterização do pigmento tipo-melanina produzido pelo fungo *Aspergillus nidulans*.
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado.

3. Comunicações em congressos

GONÇALVES, Rita de Cássia Ribeiro; CARLOS, Iracilda Zeppone; SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro. Effect of the melanin extracted from *Aspergillus nidulans* in nitric oxide production In: 6º International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007, Ribeirão Preto. **Program and Abstracts** , 2007.

GONÇALVES, R. C. R.; KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; SPONCHIADO, S. R. P. Evaluation of antiradical and chelating activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de

Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2006, Águas de Lindóia. **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq.** 2006.

LEITE, Carla Andréia; GONÇALVES, Rita de Cássia Ribeiro; SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro. Extração e quantificação da melanina produzida pelo fungo *Aspergillus nidulans* In: XVIII Congresso de Iniciação Científica UNESP 2006, Botucatu. **Anais do Congresso de Iniciação Científica 2006**, 2006.

GONÇALVES, R. C. R.; KITAGAWA, R. .R.; RADDI, M. S. G.; SPONCHIADO, S. R. P. Cytotoxic activity of the melanin extracted from *Aspergillus nidulans*. In: 5TH International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005, Ribeirão Preto. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2005. v. 41, p. 130-130.

GONÇALVES, Rita de Cássia Ribeiro; SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans* In: 4th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP 2003), 2003, Ribeirão Preto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2003.

4. Trabalhos científicos publicados

GONÇALVES, Rita de Cássia Ribeiro, SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro. Antioxidant Activity of the Melanin Pigment Extracted from *Aspergillus nidulans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** , v.28, p.1129 - 1131, 2005.

GONÇALVES, Rita de Cássia Ribeiro, SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro. Characterization of pigment produced by *Aspergillus nidulans* as DOPA-melanin. **Canadian Journal of Microbiology** , 2008 (submetido).

5. Palestras ou cursos ministrados

Atividade Antioxidante de Melaninas de Fungos (2007)

Tipo: Seminário geral

Entidade: UNESP – Instituto de Química

Farmacologia de Medicamentos Anti-hipertensivos e Hipoglicemiantes (2007)

Tipo: Curso de curta duração

Entidade: UNIP – Unidade Universitária de Araraquara

Interações Medicamentosas em Pacientes Hipertensos e Diabéticos (2007)

Tipo: Curso de curta duração

Entidade: UNIP - Unidade Universitária de Araraquara

Desenvolvimento de Fármacos (2005)

Tipo: Palestra

Entidade: UNIP - Unidade Universitária de Araraquara

6. Experiência profissional

6.1 - UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

Vínculo Institucional – professor adjunto (horista)

Unidade Universitária de Bauru

- *Curso de Farmácia*

  Disciplinas ministradas:

  1. *Química Farmacêutica – agosto de 2002 a dezembro de 2004*

Unidade Universitária de Araçatuba

- *Curso de Farmácia*

  Disciplinas ministradas:

  1. *Química Farmacêutica – agosto de 2002 a dezembro de 2004*

Unidade Universitária de Araraquara

- *Curso de Farmácia*

  Disciplinas ministradas:

  1. *Farmacologia – desde agosto de 2002 (atual)*
  2. *Enzimologia e Tecnologia das Fermentações – desde agosto de 2002 (atual)*
  3. *Química Farmacêutica – desde agosto de 2002 (atual)*

- *Curso de Enfermagem*

Disciplinas ministradas:

1. *Farmacologia – agosto de 2002 a dezembro de 2007*

6.2 - CENTRO UNIVERSITÁRIO CENTRAL PAULISTA – UNICEP

Vínculo Institucional – professor assistente 20 horas (regime parcial)

- *Curso de Farmácia*

  Disciplinas ministradas:

  1. *Química Farmacêutica – desde março de 2005 (atual)*
  2. *Farmacologia I e II – desde fevereiro de 2007 (atual)*
  3. *Orientação de Estágio II (Farmácia Comunitária e/ou Farmácia Hospitalar e/ou Farmácia Homeopática e/ou Farmácia de Manipulação) – agosto de 2006 a dezembro de 2007*

- *Curso de Fisioterapia*

  Disciplinas ministradas:

  1. *Farmacologia - desde fevereiro de 2007 (atual)*

À meu esposo *Rodrigo,*

pelo amor, carinho, amizade, respeito.....

Por sempre me apoiar nos momentos difíceis, acreditar no meu potencial e por ser o pai dos meus bens mais preciosos: ***João Pedro*** *e* ***Felipe****.*

Vocês representam a energia que alimenta minha vida,

Obrigada.

Aos meus pais, *João* **e** *Deusani,*

que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis.

Ensinaram-me que a sabedoria,

é o bem mais precioso que um homem pode ter.

Sempre me espelhei na dignidade, humildade e força de vocês.

Obrigado pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim.

*À minha irmã, **Priscila**,*
pela cumplicidade, carinho e amor que sempre demonstrou por mim.

*Agradeço à **Deus**, por pertencer à esta família.*

*Á **Sandra**, minha orientadora,*
Que foi sempre compreensível e amiga.
Meu crescimento científico se deve ao seu incentivo e sabedoria.
Obrigada.

A conclusão desta tese só se fez possível mediante a participação de muitos colaboradores, os quais contribuíram direta ou indiretamente não somente para o desenvolvimento deste trabalho, mas também para meu crescimento pessoal.

Ficam aqui expresso meus sinceros agradecimentos:

À ***Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi*** *pela amizade, imensa colaboração, incentivo e sugestões.*

Ao ***Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli*** *pelo direcionamento e grande colaboração na etapa de determinação estrutural.*

À ***Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda*** *pela simpatia, apoio e suporte dado no teste de Mutagenicidade.*

À ***Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos*** *pela grande simpatia, prestatividade, colaboração e suporte nos ensaios imunológicos.*

À ***Fátima*** *pela amizade, companheirismo e auxílio durante todo desenvolvimento experimental.*

À ***Carla*** *pela colaboração e apoio com a técnica de mutagenicidade.*

Às amigas de laboratório ***Thaís*** *e* ***Marina*** *pelo incentivo na realização da tese.*

*Às amigas **Karina, Karina Ponsoni e Débora** pela colaboração, incentivo e momentos de diversão.*

*Aos funcionários **Zilda, Valdenir** e **Tarcísio** pelos momentos de descontração e apoio no desenvolvimento da tese.*

*À **Marisa** pela amizade, simpatia e grande auxílio no desenvolvimento experimental com macrófagos.*

*Ao amigo **Alberto** pela grande colaboração na etapa final desse trabalho com os espectros de massas, pelo incentivo e momentos de diversão.*

Aos professores da Universidade Estadual de Maringá pela contribuição na minha formação acadêmica.

*À **Maria do Carmo** e **Nancy** pela amizade, momentos de descontração e apoio principalmente com as células McCoy.*

*À seção de pós-graduação: **Sandra, Célia** e **Patrícia** pela simpatia, atenção e prestatividade.*

COLABORADORES

A determinação estrutural por espectrometria de massas foi realizada no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, sob a supervisão do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. Os experimentos para avaliação da resposta imune foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Os testes de mutagenicidade foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Os testes de citotoxicidade foram feitos sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) e a técnica de ressonância paramagnética eletrônica foi realizada no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP), campus de São Carlos, com a supervisão do grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas".

Mais importante que o conhecimento é a imaginação....

Se o conhecimento nos permite alcançar os limites do universo, a imaginação nos faz transpor os seus umbrais. Não existe a formação do conhecimento sem a ousadia do pensar (Albert Einstein)

RESUMO

Do fungo *Aspergillus nidulans* foi isolado um mutante que apresenta produção aumentada do pigmento melanina. Este pigmento, formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos, pode estar presente na parede celular ou no meio de cultura. Embora não seja essencial para o crescimento dos fungos, a melanização parece aumentar a capacidade de sobrevivência das espécies em condições desfavoráveis, fornecendo proteção contra radiação UV, altas temperaturas, enzimas hidrolíticas, metais pesados e agentes oxidantes. A obtenção deste pigmento, na forma pura, tem despertado interesse biotecnológico devido a sua utilização em formulações cosméticas, principalmente pela sua propriedade fotoprotetora e antioxidante. Tendo em vista o potencial farmacológico do pigmento melanina, este trabalho tem como objetivos fazer a caracterização estrutural e funcional do pigmento extraído do fungo *A. nidulans*. Os resultados de espectrometria de massas indicam que a estrutura da melanina do fungo *A. nidulans* é composta de duas grandes unidades, representadas pelos fragmentos de massas moleculares igual a 573 e 550, com grupamentos diidroxindol e anéis pirrólicos substituídos. Os ensaios de citotoxicidade mostram que a melanina extraída do fungo *A. nidulans* não causa danos significativos aos componentes celulares, tanto antes como pós metabolização. Os ensaios de mutagenicidade sugerem que a melanina não apresenta propriedades mutagênicas para as linhagens TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 102 de *Salmonella thyphimurium*. No teste antimicrobiano, observa-se que a melanina do fungo não apresenta potencial como antibacteriano frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, quando comparadas com as substâncias de referência, ampicilina e cloranfenicol. Quanto à atividade imunomoduladora foi verificado que a melanina não estimula a liberação de NO e exerce uma inibição acentuada da sua produção, e em relação ao TNF-α, foi observada estimulação da liberação, mas a presença do pigmento causa uma pequena inibição na sua produção. Os resultados dos ensaios antioxidantes realizados demonstram a capacidade da melanina de impedir a formação de oxidantes extremamente reativos como o radical hidroxil por diversas maneiras, como quelando o Fe^{2+}, impedindo a ação do peróxido de hidrogênio e do radical superóxido. A atividade antioxidante da melanina foi confirmada pelo espectro de ressonância paramagnética eletrônica, que mostrou a presença de grupos capazes

de doar ou aceitar elétrons, sugerindo a capacidade da melanina do fungo de neutralizar os radicais livres. A grande importância destes resultados está centrada no potencial deste pigmento de se tornar uma estratégia terapêutica, pois o pigmento apresenta baixa citotoxicidade, não apresenta potencial mutagênico, pode inibir mediadores inflamatórios como o TNF-α e NO e bloqueia a geração de vários oxidantes.

ABSTRACT

A mutant that presents increased production of the melanin pigment was isolated from the *Aspergillus nidulans* fungus. This pigment, formed by the oxidative polymerization of phenolic and/or indolic compounds, can be present in the cellular wall or culture medium. Although it is not essential for the fungal growth, melanization seems to increase the survival capacity of the species in unfavorable conditions, supplying protections against UV radiation, high temperatures, hydrolytic enzymes, heavy metals and oxidants agents. The attainment of this pigment, in its pure form, has taken biotechnological interest due to its use in cosmetic formulations, mainly for its photoprotector and antioxidant property .Considering the pharmacological potential of the melanin pigment, this study aims to make the structural and functional characterization of the pigment extracted from *A. nidulans* fungus. The results of mass spectrometry indicate that the melanin structure of the *A. nidulans* fungus is composed of two large units, represented by the fragments of molecular mass equal to 573 and 550, with dihydroxyindole groups and substituted pyrrolic rings. The cytotoxicity assays have shown that the melanin extracted from the *A. nidulans* fungus does not cause significant damages to the cellular components, before and after metabolization. The mutagenicity assays suggest that the melanin does not present mutagenic properties for the strains TA 97a, TA 98, TA 100 and TA 102 of *Salmonella thyphimurium.* In the antimicrobial test, it is observed that the fungal melanin does not present antibacterial potential facing *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli,* when compared to the reference substances, ampicilin and cloranphenicol. Regarding the immunomodulatory activity, it was verified that the melanin does not stimulate NO release and exerts an accented inhibition of its production ,and in relation to TNF-α, was observed release stimulation, but the presence of such pigment causes a small inhibition in its production. The results of the oxidant assays show the capacity of the melanin to hinder the formation of extremely reactive oxidants such as the hydroxyl radical in several ways, quelating the Fe^{2+}, hindering the action of the hydrogen peroxide and superoxide radical. The antioxidant activity of the melanin was confirmed by the spectrum of electronic paramagnetic resonance showing the presence of groups that are able to donate or accept electrons, and suggesting the capacity of the fungal melanin to neutralize the free radicals. The great importance of these results is

centered in the potential of such pigment to become a therapeutical strategy, since the pigment presents low cytotoxicity, does not present mutagenic potential, is able to inhibit inflammatory mediators such as the TNF-α and NO and blocks the generation of several oxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Crescimento das linhagens selvagem e mutantes do fungo *A. nidulans*	28
Figura 2	Substâncias precursoras de melaninas	30
Figura 3	Via de síntese da DOPA-melanina	31
Figura 4	Estrutura da melanina proposta por NICOLAUS e por HEMPEL	32
Figura 5	Representação esquemática sobre as fontes externas e internas de geração de oxidantes	36
Figura 6	Reação de redução tetravalente do oxigênio molecular	36
Figura 7	Etapas de extração da melanina extracelular	48
Figura 8	Espectros de infravermelho da melanina obtida do fungo *A. nidulans*, submetida ou não ao processo de purificação por hidrólise	64
Figura 9	Cromatografia em camada delgada da melanina extraída do fungo *A. nidulans* (M1) e da melanina sintética (S)	66
Figura 10	Fragmentograma (*ESI*, modo positivo) da melanina do fungo *A. nidulans*	68
Figura 11	Fragmentograma de *ESI*-MS/MS (modo positvo, 35 eV) monitorando os fragmentos “filhos” de *m/z* 573 u.	70
Figura 12	Estruturas propostas para o fragmento com *m/z* 573 u e de seus fragmentos “filhos”.	71
Figura 13	Fragmentograma de *ESI*-MS/MS (modo postivo, 40 eV), monitorando os fragmentos “filhos” de *m/z* 550 u	72
Figura 14	Estruturas propostas para o fragmento com *m/z* 550 u e seu fragmento “filho”.	73
Figura 15	Fragmentograma de *ESI*-MS/MS (modo postivo, 45 eV), monitorando os fragmentos “filhos” de *m/z* 522	74
Figura 16	Estruturas propostas para o fragmento com *m/z* 522 e seu fragmento “filho”	75
Figura 17	Fragmentograma de *ESI*-MS/MS (modo postivo, 15 eV), monitorando os fragmentos “filhos” de *m/z* 397 u	76

Figura 18	Estruturas propostas para a espécie com *m/z* 397 u e seu fragmento “filho”	77
Figura 19	Fragmentograma de ESI-MS/MS (modo postivo, 20 V), monitorando os fragmentos “filhos” de *m/z* 325 u	78
Figura 20	Estruturas propostas para a espécie com *m/z* 325 u e seus fragmentos “filhos”	79
Figura 21	Espectro de EPR da melanina sintética	81
Figura 22	Espectro de EPR da melanina extraída do fungo *A. nidulans*	81
Figura 23	Estrutura parcial de melaninas mostrando grupos semiquinonas responsáveis pelos sinais na análise por EPR	82
Figura 24	Principais reações de biotransformação catalisadas pelo citocromo P450	85
Figura 25	Curva dose-resposta de diferentes concentrações de ciclofosfamida na ausência e presença de sistema de ativação metabólica (S9)	87
Figura 26	Curva dose-resposta de diferentes concentrações da melanina extraída do fungo *A.nidulans* (a) e da melanina sintética (b) na ausência e na presença de sistema de ativação metabólica (S9)	87
Figura 27	Microscopia óptica das células McCoy na ausência (A) e na presença da melanina extraída do fungo *A. nidulans* (B)	88
Figura 28	Relação dose-resposta do crescimento de *Escherichia coli* (A), *Enterococcus faecalis* (B) *e Sthaphylococcus aureus* (C) para melanina sintética e para com a melanina extraída do fungo *Aspergillus nidulans*	95
Figura 29	Reação de redução do DPPH	97
Figura 30	Efeito da melanina extraída do fungo *A. nidulans* e da melanina sintética na redução do radical livre DPPH	98
Figura 31	Porcentagem de inibição da ação do radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) sobre a pentose na presença de diversas concentrações de pigmento do fungo *A. nidulans*, melanina sintética e Trolox	100

Figura 32	Porcentagem de inibição da oxidação do vermelho de fenol por diferentes concentrações de melanina extraída do fungo *A.nidulans*, da melanina sintética e do trolox	102
Figura 33	Porcentagem de efeito quelante do íon Fe^{2+} na presença de diversas concentrações da melanina do fungo *A. nidulans*, melanina sintética e EDTA	104
Figura 34	Quantificação da formação do ânion superóxido na presença da melanina extraída do fungo *A. nidulans* (Mel1) e da melanina sintética (Mel sint) em concentrações de 50, 100, 150 e 200 µg/mL em função do tempo	105
Figura 35	Porcentagem de inibição da formação do ânion superóxido na presença de diferentes concentrações de melanina extraída do fungo *A. nidulans*, melanina sintética e Trolox	106
Figura 36	Efeito de várias concentrações da melanina extraída do fungo *A. nidulans*, sobre a formação de ácido úrico	107
Figura 37	Microscopia óptica de macrófagos (A), e macrófagos na presença de melanina (C e D) utilizando a coloração de coloração de May-Grunwald e Giemsa e macrófagos na presença de LPS (D) corados com Giemsa	109
Figura 38	Efeito de diferentes concentrações de melanina extraída do fungo *A. nidulans* na viabilidade de macrófagos peritoneais e da célula L929	111
Figura 39	Produção de TNF-α na presença de diferentes concentrações de melanina extraída de fungo *A. nidulans*.	111
Figura 40	Produção de NO na presença de diferentes concentrações de melanina extraída de fungo *A. nidulans*.	112
Figura 41	Efeitos das diferentes concentrações de melanina extraída do fungo *A. nidulans* na produção de NO	113
Figura 42	Efeitos das diferentes concentrações de melanina extraída do fungo *A. nidulans* na produção de TNF-α	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relações das substâncias mutagênicas utilizadas como controle positivo	53
Tabela 2	Índice citotóxico (IC_{50}) da melanina sintética e da melanina extraída do fungo *A. nidulans*	84
Tabela 3	Índice citotóxico (IC_{50}) após metabolização pela fração S9 da melanina sintética e da melanina extraída do fungo *A. nidulans*	86
Tabela 4	Número de revertentes e valores de RM da melanina extraída do fungo *A. nidulans* com e sem ativação metabólica sobre a linhagem TA97a de *S. typhimurium.*	90
Tabela 5	Número de revertentes e valores de RM da melanina extraída do fungo *A. nidulans* com e sem ativação metabólica sobre a linhagem TA98 de *S. typhimurium.*	91
Tabela 6	Número de revertentes e valores de RM da melanina extraída do fungo *A. nidulans* com e sem ativação metabólica sobre a linhagem TA100 de *S. typhimurium.*	92
Tabela 7	Número de revertentes e valores de RM da melanina extraída do fungo *A. nidulans* com e sem ativação metabólica sobre a linhagem TA102 de *S. typhimurium.*	93
Tabela 8	Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em μg/mL do pigmento tipo-melanina e da melanina sintética	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida
CCD: cromatografia em camada delgada
CIM: concentração inibitória mínima
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
cNOS: óxido nítrico sintetase constitutiva
CYP 450: citocromo P 450
DHI: 5,6-diidroxindol
DHICA: 5,6-diidroxindol-2-ácido carboxílico
DHN: diidroxinaftaleno
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucléico
DOPA: diidroxifenilalanina
DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
DTNB: ácido 5-5'-ditio(2-nitrobenzóico)
EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético
EM: espectrometria de massas
eNOS: óxido nítrico sintetase endotelial
eV: eletron volt
EPR: Electron paramagnetic resonance
EROs: espécies reativas de oxigênio
ESI: electrospray ionisation
G-6-P: glicose-6-fosfato
GDHB: γ-glutaminil-3,4-diidroxibenzeno
GHB: γ-glutaminil-4-hidroxibenzeno
GSH: glutationa reduzida
GSH-Px: glutationa peroxidase
GSH-Rd: glutationa redutase
H_2O_2: peróxido de hidrogênio
$HO_2^{\bullet}$: hidroperoxila
HOCl: ácido hipocloroso
IC_{50}: índice citotóxico
IFN-γ: interferon-gama

IL-1: interleucina-1

IL-6: interleucina-6

iNOS: óxido nítrico sintetase induzível

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*

MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization

MPO: mieloperoxidase

MS: mass spectrometry

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT: nitro blue tetrazólio

nm: nanômetro

nNOS: óxido nítrico sintetase neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

NQO: 4-nitroquinolina-1-óxido

O_2^{-}: ânion superóxido

$OH^{\cdot}$: radical hidroxil

ONOO: peroxinitrito

ONOOH: peroxinitroso

PBS: solução salina tamponada com fosfato

RM: razão de mutagenicidade

RMN: ressonância magnética nuclear

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SOD: superóxido dismutase

TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

TNF-α: fator de necrose tumoral-α

UI: unidades internacionais

UV: ultravioleta

VN: vermelho neutro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 26

2 OBJETIVOS 44

3 MATERIAIS E MÉTODOS 46

3.1 Microorganismo 47

3.2 Cultivo do microorganismo 47

3.3 Extração e purificação do pigmento 47

3.4 Análise cromatográfica da melanina 48

3.5 Análise espectrométrica de infravermelho da melanina 48

3.6 Análise da melanina por espectrometria de massas 49

3.7 Análise do pigmento por ressonância paramagnética eletrônica (EPR) 49

3.8 Determinação da citotoxicidade basal *in vitro* da melanina 50

3.9 Avaliação da morfologia das células McCoy na presença de melanina..... 51

3.10 Determinação da atividade mutagênica *in vitro* da melanina 51

3.11 Determinação da atividade antimicrobiana da melanina 53

3.12 Determinação da atividade antioxidante da melanina..... 54

3.11.1 Teste do DPPH 55

3.11.2 Análise do peróxido de hidrogênio 55

3.11.3 Ensaio da deoxirribose 56

3.11.4 Atividade quelante de Fe^{2+} 56

3.11.5 Reação com radical superóxido 57

3.11.6 Ensaio da atividade da xantina-oxidase 57

3.13 Avaliação da resposta imunológica na presença da melanina 58

3.13.1 Obtenção de macrófagos peritoneais..... 58

3.13.2 Avaliação do processo de fagocitose na presença de melanina 58

3.13.3 Teste para detecção da produção de fator de necrose tumoral (TNF-α) 59

3.12.3 Teste para a detecção da produção de Óxido Nítrico (NO) 59

3.12.4 Teste de inibição da liberação de TNF-α 60
3.12.5 Teste de inibição da liberação de NO..... 60
3.15 Análise estatística..... 61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 62
4.1 Caracterização estrutural da melanina 63
4.1.1 Análise espectrométrica de infravermelho da melanina 63
4.1.2 Análise cromatográfica da melanina 65
4.1.3 Análise da melanina por espectrometria de massas 66
4.1.4 Análise da melanina por ressonância paramagnética eletrônica (EPR) 80
4.2 Avaliação das atividades biológicas 83
4.2.1 Determinação da citotoxicidade basal *in vitro*..... 83
4.2.2 Atividade mutagênica *in vitro* da melanina 89
4.2.3 Determinação da atividade antimicrobiana da melanina 94
4.2.4 Determinação da atividade antioxidante da melanina..... 97
4.2.4.1 Teste do DPPH 97
4.2.4.2 Ensaio da deoxirribose..... 98
4.2.4.3 Análise do peróxido de hidrogênio 101
4.2.4.4 Atividade quelante de Fe^{2+} 102
4.2.4.5 Reação com radical superóxido 104
4.2.4.6 Ensaio da atividade da xantina-oxidase 106
4.2.5 Avaliação da resposta imunológica na presença da melanina 107
4.2.5.1 Determinação da produção de óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF-α) 108
4.2.5.2 Determinação da atividade inibitória na produção de óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF-α) 112
5 CONCLUSÃO 115
REFÊRÊNCIAS
APÊNDICE

1 - INTRODUÇÃO

A utilização de microorganismos vivos com finalidades práticas, como na fabricação de bebidas e alimentos, constitui uma tradição milenar. Contudo, somente nas últimas três décadas do século XX, devido às dificuldades de comércio e abastecimento de diversos materiais e à diversidade de recursos de origem biológica, os países foram estimulados a procurarem fontes alternativas de matérias-primas. Neste sentido, os fungos, em função da sua grande variabilidade genética e diversidade metabólica, vêm sendo utilizados na produção de fármacos, enzimas, solventes, ácidos orgânicos e em processos como a biorremediação e o controle de praga, pois representam uma opção mais viável do ponto de vista econômico (BARNUM, 1988; BENETT, 1998).

Entretanto, pode-se afirmar que essa exploração da diversidade microbiana ainda é muito incipiente, pois estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes na biosfera tenham sido caracterizados e descritos. Em relação aos fungos considera-se que o número total de espécies descritas seja de 150.000, isto corresponderia aproximadamente a 10% do número estimado em cerca de 1.500.000 (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000).

Atualmente, diversos programas de triagem de produtos naturais de fungos vêm sendo desenvolvidos visando à descoberta de novas substâncias com atividades biológicas (BARREIRO; FRAGA, 2001). Recentemente, em nosso laboratório, foi isolado a partir da alga *Caulerpa sp*, o fungo *Beauveria felina*, o qual produziu uma substância, relacionada as destruxinas, que apresenta atividade antimicobacteriana e citotóxica (VITA-MARQUES et al., 2008).

Dentre os fungos filamentosos, o Aspergillus nidulans é considerado um organismo modelo para vários estudos de biologia celular de eucariotos. As pesquisas com este organismo têm contribuído para o entendimento de regulação do metabolismo e desenvolvimento, controle do ciclo celular, estrutura da cromatina, função do citosesqueleto, reparo do DNA, controle de pH, morfogênese, estrutura do DNA mitocondrial e doenças genéticas humanas (GOLDURAN; MORRIS, 1995; OSMANI; MIRABITO, 2004). Este fungo também apresenta um grande potencial biotecnológico devido à produção de vários metabólitos úteis, como enzimas para indústria de alimentos e uso comercial e também proteínas heterólogas (BENETT, 1998).

O fungo *A. nidulans* é muito estudado pelo fato de apresentar uma série de vantagens experimentais, como crescimento rápido sob ampla faixa de temperatura e pH; formação de colônias compactas em meio sólido; presença dos ciclos assexual, sexual e parassexual curtos, esporos sexuais com núcleos diplóides, relativamente estáveis, adequados para os testes de ação gênica e um sistema genético bem caracterizado tendo o seu genoma totalmente seqüenciado (MARTINELLI, 1994; GALAGAN et al., 2005).

Em estudos anteriores, nós isolamos mutantes do fungo *Aspergillus nidulans*, usando o agente mutagênico 4-nitroquinolina-1-óxido (NQO), denominados MEL1 e MEL2 (POMBEIRO, 1991). Estes linhagens apresentam produção aumentada do pigmento melanina intracelular (presente no micélio) e extracelular (presente no meio de cultura, como pode ser visto na Figura 1.

O pigmento melanina, é formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos (BUTLER; DAY, 1998; JACOBSON, 2000), podendo estar presente na parede celular (melanina intracelular) formando complexos com proteínas e carboidratos (BULL, 1970; ELLIS; GRIFFITHS, 1974), e também pode ser encontrado no meio de cultura (melanina extracelular), sendo formado devido à oxidação de compostos fenólicos presentes no meio ou por aqueles que foram secretados pelo fungo (FOGART; TOBIM, 1996).

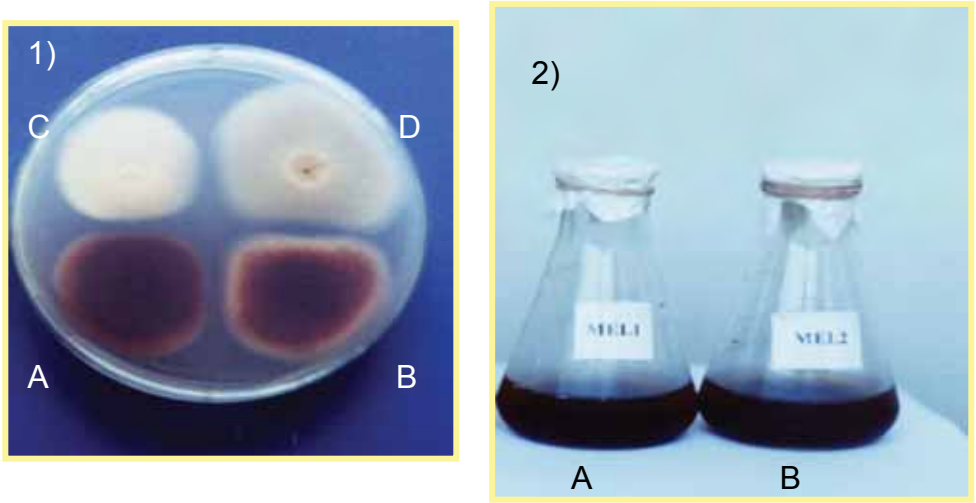
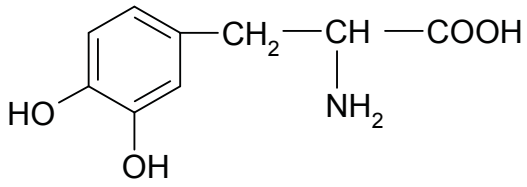


Figura 1 – Crescimento das linhagens selvagem e mutantes do fungo *A. nidulans* em meio de cultura sólido (1) e em meio de cultura líquido (2). (A e B) linhagens mutantes MEL1 e MEL2, respectivamente; (C) linhagem mutante com ausência de produção de melanina denominada 0316 e (D) linhagem selvagem denominada VE.

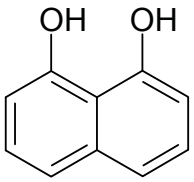
Dentro das diferentes classes dos fungos têm sido identificados vários tipos de melanina, classificadas de acordo com os seus precursores (Figura 2): catecol, 1,8-diidroxinaftaleno (DHN), γ-glutaminil-4-hidroxibenzeno (GHB) e diidroxifenilalanina (DOPA) (BUTLER; DAY, 1998; SHIVPRASAD; PAGE, 1989). Nos Basidiomicetos foram identificados a γ-glutaminil-3,4-diidroxibenzeno (GDHB) e a catecol-melanina. Na espécie *Agaricus bisporus,* parece estar presente a GDHB-melanina, pois foi encontrado GHB no micélio e corpo de frutificação do fungo (BELL; WHEELER, 1986). Por outro lado, em *Ustilago maydis,* outro componente do mesmo grupo, foi sugerido a ocorrência da catecol-melanina, pois as análises dos produtos de degradação da melanina, isolados dos esporos deste fungo, indicam a presença de catecol como precursor do pigmento (BELL; WHEELER, 1986; FOGARTY; TOBIN, 1996). O processo para formação de ambos os pigmentos é muito semelhante, ocorrendo pela ação de uma fenoloxidase sobre o precursor (GHB ou catecol) produzindo quinonas, as quais sofrem polimerização (não-enzimática) para formação da melanina (GRIFFIN, 1994).

A DHN-melanina é o tipo mais comum de melanina nos fungos, sendo encontrado em várias espécies das classes dos Ascomicetos e Deuteromicetos (JACOBSON, 2000). A identificação deste tipo de melanina foi possível pelos estudos com mutantes albinos (melanina-deficientes) do fungo *Verticillium dahliae*, nos quais as mutações responsáveis por este fenótipo, ocasionam o acúmulo de vários metabólitos (2,2'- dímero DHN), sendo estes considerados os precursores na via de biossíntese da DHN-melanina (BELL; WHEELER, 1986). Esta via é referida como uma síntese de pentacetídeos, já que o anel naftalênico da estrutura da DHN-melanina é formado pela enzima policetídeo sintase através da ciclização de cinco cetídeos obtidos de cinco moléculas de acetato (TSAI et al., 2001). Este tipo de melanina tem sido muito estudado por representar um papel importante na fitopatogenicidade de vários fungos (BUTLER; DAY, 1998).

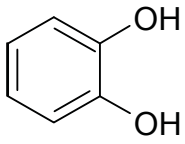
No entanto, alguns fungos da classe dos Ascomicetos, como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans e Neurospora crassa*, parecem não apresentar o pigmento do tipo DHN-melanina. Evidências mostram que a melanina presente nestes fungos pode ser do tipo DOPA-melanina, pois o pigmento isolado apresentam características espectroscópicas e reações químicas semelhantes



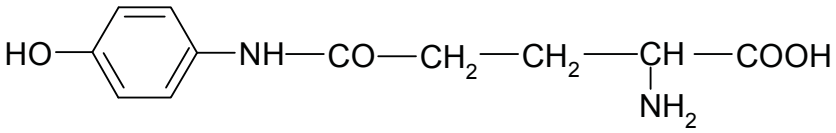
DOPA



DHN



Catecol



GHB

Figura 2 - Substâncias precursoras de melaninas.

a DOPA-melanina sintética (BELL; WHEELER, 1986; GONÇALVES, 2002). A DOPA-melanina é formada pela oxidação da tirosina a DOPA pela enzima tirosinase seguido de uma série de reações não-enzimáticas (Figura 3) (BLOIS, 1978).

Embora as melaninas estejam distribuídas em vários reinos, atingindo desde microorganismos até o homem, a sua estrutura química ainda não está definida. Este fato pode ser devido à contaminação e baixo índice de recuperação durante o processo de obtenção e às dificuldades de purificação e caracterização do pigmento, pois as melaninas apresentam-se como compostos amorfos (NOSANCHUK et al., 1999). Várias hipóteses têm sido lançadas, segundo NICOLAUS (1964), partindo do precursor DOPA, a melanina consistiria de unidades indólicas com grupos 2-carboxila, que poderiam variar nos tipos de ligações dos monômeros (Figura 4), estrutura esta que foi deduzida através de análises cromatográficas e eletroforéticas dos produtos de degradação de melaninas sintética e natural (extraída de animais marinhos). Posteriormente, HEMPEL em 1966 (apud BLOIS, 1978) propôs um copolímero de dopaquinona, 5,6-indolquinona, 5,6-indolquinona-2-ácido carboxílico (Figura 4), deduzida a partir de melanina extraída de ratos com melanoma que haviam recebido injeção de preparações de DOPA marcadas com ^{3}H e ^{14}C, injetadas em ratos com melanona, com subseqüente extração da melanina.

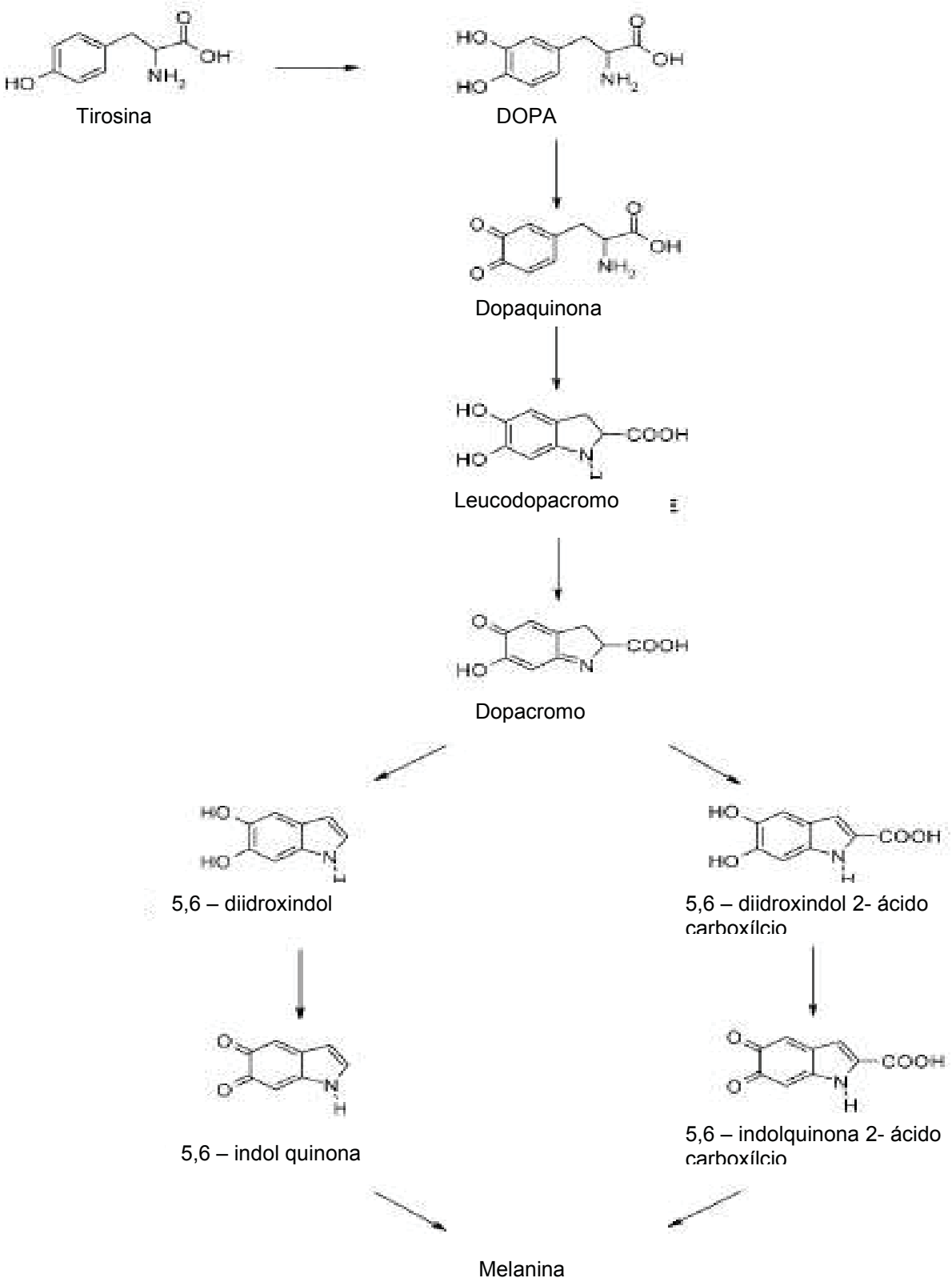


Figura 3 – Via de síntese da DOPA-melanina (retirado de BERTAZZO et al., 2001).

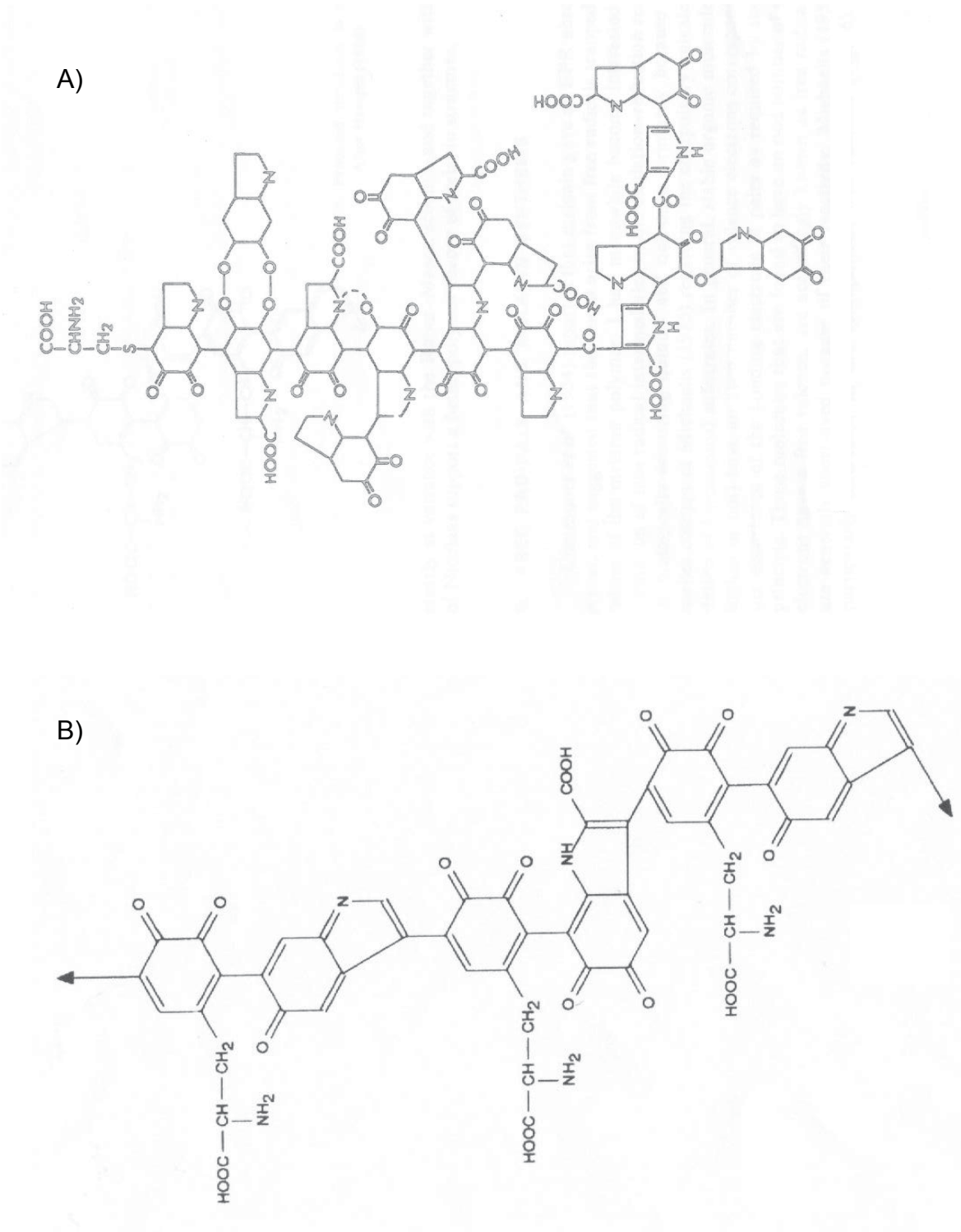


Figura 4 - Estruturas propostas para a melanina por Nicolaus (A) e Hempel (B). Ambas estruturas retiradas de Blois (1978).

O progresso tecnológico, principalmente a partir dos anos 80, alcançado por técnicas cromatográficas e de elucidação estrutural [ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM)] e, mais recentemente, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à RMN e EM, têm permitido maior rapidez na identificação de substâncias ativas de origem natural. Técnicas de espectrometria de massas, como impacto eletrônico e bombardeamento por átomos rápidos, foram utilizadas na análise de intermediários da melanogênese, confirmando as primeiras etapas da via proposta por RAPER e MASON em 1920, no qual tirosina é convertida enzimaticamente a DOPA, diidroxindol, 5,6-indolquinona, para posteriormente formar a melanina (Figura 3) (ALLEGRI et al., 1990) . Em outros estudos, usando espectrometria de massas por ionização dessorção de matriz assistida por laser (MALDI) mostrou a presença de vários oligômeros de 5,6-diidroxindol-2-ácido carboxílico (DHICA) (Figura 3) (BERTAZZO et al., 2001).

O processo de melanização não é essencial para o crescimento dos fungos, no entanto, parece aumentar a capacidade de sobrevivência das espécies em condições desfavoráveis (ZHADANOVA; BORISYUK; ARTZATBANOV, 1990). Vários estudos têm mostrado que o pigmento melanina fornece proteção contra radiação UV, altas temperaturas, enzimas hidrolíticas, metais pesados, agentes oxidantes (BUTLER; DAY, 1998; JACOBSON, 2000). A preponderância de fungos escuros sobre amostras de rochas e folhas de árvores pode ser indicativo do efeito protetor das melaninas contra raios UV (luz solar) e dessecação (BUTLER; DAY, 1998).

Em alguns casos, a habilidade de certos fungos em produzir melanina também parece ser importante para a patogenicidade (JACOBSON, 2000). A penetração da parede celular de plantas por determinados fungos parasitas é realizado por uma estrutura celular especializada, denominada apressório, na qual a DHN-melanina é um componente necessário, pois fortalece esta estrutura para exercer a pressão na parede. Por isso, componentes que inibem a biossíntese de DHN-melanina, são usados como antifúngicos na agricultura; eles não matam os patógenos das plantas, mas causam o desenvolvimento de um apressório defeituoso devido à perda da melanina, o qual é incapaz de penetrar no epitélio da planta e estabelecer a infecção (BUTLER; DAY, 1998). A antracnose, doença que ocorre em pepinos e feijão, causada por *Colletotrichum lagenarium*, pode ser

controlada pela aplicação de triciclazol, que inibe a biossíntese deste tipo de melanina (KUBO et al.,1985). Além disso, alguns trabalhos relatam a existência de uma relação direta entre a presença de melanina na parede celular de certos fungos e sua resistência à lise (POTGIETER; ALEXANDER, 1966; KUO; ALEXANDER, 1967). Estudos com *A. nidulans* estabeleceram que a resistência a lise é afetada pela concentração do pigmento na parede celular; sugerindo que o material poliaromático das melaninas não permitiria a ação de enzimas que degradam a parede, mantendo a integridade dos constituintes localizados na superfície (BIOOMFIELD; ALEXANDER, 1967; KUO; ALEXANDER, 1967). Esta função do pigmento melanina em consolidar os componentes da parede, levando consequentemente ao fortalecimento desta contra a degradação e a lise, pode ser comparado à cutícula nos insetos ou a casca das sementes (CLUTTERBUCK, 1990). Pesquisas feitas com *Cryptococcus neoformans*, mostraram uma ação semelhante, onde o pigmento tipo-melanina se liga a proteínas da parede celular da levedura, dando proteção contra o ataque enzimático de proteínas leucocitárias (JACOBSON, 2000).

A melanina também parece estar relacionada à proteção do microorganismo à ação de vários fármacos. Cultura melanizada de *C. neoformans*, sobrevive uma hora a mais no tratamento com anfotericina B, provavelmente porque a melanina presente na parede celular deste organismo diminui a permeabilidade à droga (WANG; CASADEVALL, 1994). Por outro lado, a melanina pode funcionar como alvo para antifúngicos, potencializando seu efeito, devido a sua maior afinidade por estas drogas. O antipsicótico trifluoperazina apresenta atividade antimicrobiana contra uma variedade de patógenos devido à sua alta afinidade por melanina. Estudos *in vivo* e *in vitro* com *C. neoformans* mostraram uma maior atividade desta droga contra células melanizadas (WANG; CASADEVALL, 1996). Outro exemplo seria do antimalárico cloroquina que tem se mostrado tóxico a células de melanoma, inibindo o crescimento celular, como resultado da sua habilidade de se ligar à melanina (LARSSON, 1993; KNÖRLE et al., 1998).

Os estudos da via melanogênica também têm despertado interesses na estratégia de tratamento e diagnóstico do melanoma maligno, pois o alto nível de pigmentação das células parece desempenhar um outro papel na eficácia do tratamento desta neoplasia, ligando e inativando algumas drogas antineoplásicas e

modificando os efeitos da radiação ionizante (NOSANCHUK et al*.,* 1999; RILEY, 1997).

Evidências da literatura também sugerem que a melanina pode apresentar atividade antimicrobiana. SADIK et al. (2002) verificaram que um composto com características semelhantes à melanina extraído das folhas da espécie *Vanda roxburghii*, apresentou atividade contra *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Escherichia coli* e *Shigella dysenteriae.*

Outra função sugerida para os pigmentos tipo-melanina seria como protetor ao ataque de radicais livres de oxigênio e nitrogênio, funcionando como um tampão redox, neutralizando estes oxidantes (WANG; CASADEVALL, 1994; JACOBSON; HOVE; EMERY, 1995). GÓMEZ et al. (2001) observaram que células melanizadas de *C. neoformans* são menos susceptíveis aos danos causados durante a fagocitose mediada por macrófagos. O efeito da melanina em aumentar a sobrevivência do fungo pode ser principalmente devido a sua capacidade de ligação às espécies reativas de oxigênio (EROs) (JACOBSON; TINNEL, 1993).

Estas espécies são geradas com o aumento do consumo de oxigênio, durante processos de respiração mitocondrial, metabolismo de poluentes e medicamentos e no processo de combate aos microorganismos invasores pelos fagócitos (Figura 5) (JANG, 1999; PRIOR; CAO, 1999; AUGUSTO, 2006). Nestas condições do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando em formação de H_2O (Figura 6) (DAHLGREN; KARLSSON, 1999; BABIOR, 2000). No entanto, durante esse processo são formados intermediários reativos (EROs), como os radicais superóxido (O_2^-) formado a partir de oxigênio e NADPH pela enzima NADPH oxidase, hidroperoxila ($HO_2^\bullet$) que representa a forma protonada do radical superóxido, o hidroxil ($OH^\bullet$) considerada a espécie mais reativa em sistemas biológicos, pois sua combinação extremamente rápida com metais ou outros radicais, pode lesar o DNA e iniciar a peroxidação lipídica, e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado pela ação da superóxido dismutase no ânion superóxido, um radical extremamente importante, pois participa da formação de oxidantes de alta reatividade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; JANG, 1999; PRIOR; CAO, 1999; AUGUSTO, 2006). A partir destas espécies iniciais são gerados oxidantes secundários, como o ácido hipocloroso (HOCl), formado a partir de peróxido de hidrogênio pela ação da mieloperoxidase (DAHLGREN; KARLSSON, 1999; BABIOR, 2000). Em sistemas biológicos, o ácido hipocloroso

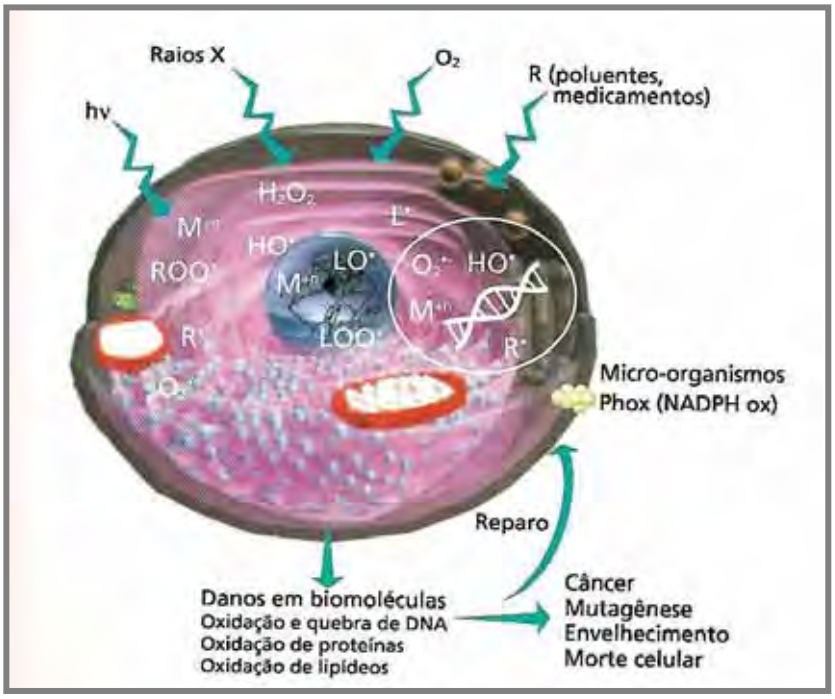


Figura 5 - Representação esquemática sobre as fontes externas e internas de geração de oxidantes, suas funções celulares e os danos causados às biomoléculas (Retirado de AUGUSTO, 2006).

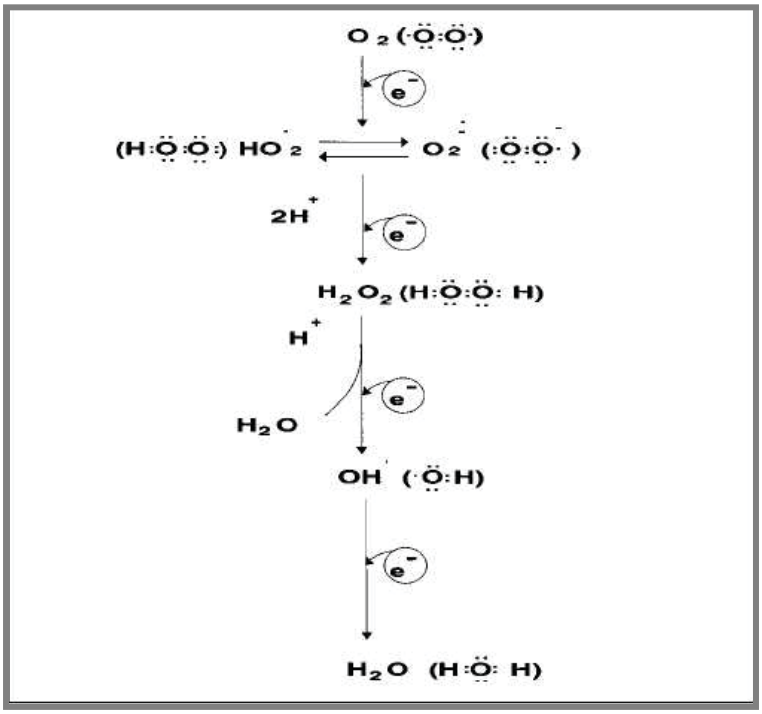


Figura 6 - Reação de redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

pode ser considerado o oxidante mais abundante e mais tóxico, pois rapidamente ataca uma grande variedade de moléculas fisiologicamente relevantes e muitas vezes podem gerar outras espécies oxidantes com o oxigênio singleto e o radical hidroxil (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

Um estímulo exagerado na produção de espécies reativas de oxigênio, associado a uma falha na defesa antioxidante, pode causar danos a biomoléculas importantes como lipídios, proteínas e DNA, contribuindo para a patogenia de várias doenças inflamatórias crônicas imunes e não-imunes (FERREIRA et al., 1997; PARIJ, 1998; AUGUSTO, 2006) e patologias pulmonares, como enfisema e asma (HALLIWELL, 1995; DAHLGREN; KARLSSON,1999; BABIOR, 2000).

Os oxidantes podem causar danos em todos os componentes celulares, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade. Como conseqüência, ocorre perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular. Este processo está envolvido no envelhecimento, no desenvolvimento de arteriosclerose e câncer e também contribui na patogênese de doenças neurodegenerativas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BYSHNEVA; SENCHUK, 1999; AUGUSTO, 2006).

Para prevenir os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio existe uma variedade de sistemas de defesa antioxidante, os quais podem atuar em duas linhas, uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, e a outra tem a função de reparar a lesão ocorrida. A primeira linha de defesa é constituída por glutationa reduzida (GSH), presente na maioria das células, e a qual a sua capacidade redutora é determinada pela presença do grupamento –SH, e protege contra a lesão resultante da exposição aos íons ferro; a superóxido dismutase (SOD), uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio; a catalase, uma hemeproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2; a glutationa peroxidase (GSH-Px), que catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus respectivos álcoois e por fim a vitamina E, uma vitamina lipossolúvel que pode inativar os oxidantes produzidos durante a peroxidação lipídica. A outra linha de defesa é constituída pela glutationa redutase (GSH-Rd) que regenera a glutationa

(GSH), pelo ácido ascórbico e por outras substâncias. (HALLIWELL, 1995; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LIU, 2000; ARUOMA, 2003).

Várias evidências têm mostrado que melaninas naturais, extraídas de vários microorganismos, desempenham função antioxidante. Derivados fenólicos, como as melaninas, são considerados substâncias antioxidantes naturais, pois agem como doadores e aceptores de prótons e elétrons, sendo que as melaninas interagem com radicais livres e outras espécies reativas devido à presença de elétrons não-pareados na molécula (SHCHERBA et al., 2000). No fungo *C. neoformans,* foi encontrado que as células melanizadas sobreviviam aproximadamente 10 vezes mais que as células não-melanizadas quando em contato com os radicais livres de oxigênio e nitrogênio, sugerindo que o papel da melanina na virulência seria proteger os patógenos contra radicais livres gerados imunologicamente (JACOBSON, HOVE, EMERY, 1995; DOERING et al., 1999). Em infecções pulmonares, freqüentemente letais em imunodeprimidos, como a aspergilose causada por fungos do gênero *Aspergillus* spp e fibrose cística causada pela bactéria *Bulkhoderia cepacia*, observou-se que as linhagens não-melanizadas, após incubação com fagócitos, eram mais danificadas (cerca de 10 a 12 vezes mais sensíveis aos oxidantes produzidos) do que as linhagens selvagens melanizadas, por conseqüência, quando estes mutantes albinos (não-melanizados) foram inoculados em ratos demonstraram ser menos letais (ZUGHAIER; RILEY; JACKSON, 1999; JAHN et al., 2000). BYSHNEVA e SENCHUK (1999) observaram que o pigmento tipo-melanina obtido do fungo *Cladosporium cladosporidae* também apresenta atividade antioxidante, o qual foi determinado pela habilidade deste pigmento de quelar Fe^{2+} , interferindo na peroxidação lipídica. Em estudos anteriores, nós demonstramos que a melanina extraída do mutante MEL1 do fungo *A. nidulans* é capaz de neutralizar o ácido hipocloroso (HOCl) apresentando uma magnitude de inibição comparável a melanina sintética (GONÇALVES, POMBEIRO-SPONCHIADO, 2005).

Neste contexto, as melaninas despertam interesses como matéria-prima farmacêutica, em função da sua possível atividade antioxidante e/ou antiinflamatória (RILEY, 1997). No entanto, a descoberta de novos compostos é sem dúvida uma atividade multidisciplinar, onde os estudos sobre possíveis atividades biológicas, mecanismos de ação, potencial e genotóxico, devem ser realizados para que essas substâncias possam ser validadas como produtos farmacêuticos ou cosméticos.

O desenvolvimento de bioensaios simplificados, novos métodos de *screening*, introdução de testes *in vitro* que mimetizam situações análogas *in vivo*, entre outros, determinou o ressurgimento do interesse na investigação de produtos naturais como possíveis fontes de novos protótipos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 1999). Para vários compostos químicos isolados de microorganismos torna-se necessária a determinação de medidas imunotoxicológicas e imunofarmacológicas, que são pontos críticos para avaliar benefícios e riscos de compostos químicos sobre o sistema imunológico.

Testes *in vitro* foram desenvolvidos para o estudo de alguns mediadores envolvidos na resposta imune, e os fagócitos mononucleares são as células-alvo para avaliar os efeitos tóxico-farmacológicos de fármacos (WILLIANS; LENKE, 2002). O macrófago é uma das principais células envolvidas na resposta imune do hospedeiro, participando na imunidade celular e humoral, apresentação de antígenos e produzindo mediadores solúveis que regulam as funções linfocitárias. Sua importância no sistema de defesa do hospedeiro também está relacionada a processos de quimiotaxia e fagocitose. Estas células, quando se deparam com certos estímulos, como lipopolissacarídeos (LPS), um produto de bactérias Gram-negativas, sofrem um processo de ativação caracterizado por um rápido aumento no seu metabolismo, motilidade e atividade fagocítica, sendo de grande importância no processo inflamatório (WATSON, 1992). Durante este processo também secretam produtos como enzimas, componentes do sistema complemento, fatores de coagulação, e substâncias mediadoras como o óxido nítrico (NO) e o fator de necrose tumoral (TNF-α) (ROITT; DELVES, 2004).

Na década de 80, a descoberta do óxido nítrico (NO) como um mensageiro molecular envolvido em vários processos fisiológicos, tais como inibição da agregação plaquetária e regulação da citotoxicidade mediada por células, revolucionou as pesquisas acerca da extensão de sua atividade biológica (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

O NO é uma espécie reativa de nitrogênio produzido por uma variedade de células, principalmente por macrófagos. Ele é sintetizado por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintetase (NOS), que converte a L-arginina em NO e L-citrulina. Três isoenzimas foram identificadas como responsáveis pela produção de NO e foram denominadas de: neuronal (nNOS ou NOS 1), induzível (iNOS ou Nos 2) e endotelial (eNOS ou NOS 3). A iNOS é purificada e clonada a

partir de macrófagos ativados, sendo a principal responsável pela formação de NO durante os ensaios *in vitro* (SARIH; SOUVANNAVONG; ADAM, 1993).

O NO formado pode ser transformado em espécies reativas citotóxicas, como o ácido peroxinitroso (OOOH) e peroxinitrito (ONOO-) formados na reação entre NO com ânion superóxido. Estas espécies citotóxicas podem colaborar para a eliminação de microorganismos contribuindo na defesa não específica do hospedeiro, mas também podem ser lesivas, proporcionando danos inflamatórios. (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; CONNER; GRISHAM, 1996). Desta forma, o descontrole da síntese de NO está implicado na patogênese de doenças cardiovasculares, autoimunidade, septicemia, rejeição de transplantes, doenças cerebrais neurodegenerativas, indução de câncer, genotoxicidade e na inflamação (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2002; COSTA et al., 2003).

Entre as citocinas produzidas durante o processo inflamatório destacamos o TNF-α, produzido principalmente por macrófagos ativados, sendo o principal mediador da resposta inflamatória aguda, possuindo muitas funções centrais na inflamação crônica, na resposta antitumoral e nas infecções. No entanto, esta citocina também induz diversas substâncias pró-inflamatórias nas células endoteliais, incluindo a produção de outras citocinas, a expressão de moléculas de adesão e a liberação de substâncias pró-coagulantes relacionadas ao choque séptico, a estimulação de linfócitos T e B, induzindo a febre e ainda a supressão da lipase lipoprotéica contribuindo para a caquexia (EIGLER et al., 1998; MOURA; POMERANTZEFF; GOMES, 2001; ODEH, 2007). Agentes que bloqueiam a síntese de TNF-α, como a sulfassalazina e o infliximab (anticorpo monoclonal anti-TNFα), têm sido usados no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como a doença de Chron e artrite reumatóide (BALDAIA et al., 2002; TAYLOR, 2003). Neste sentido, agentes que modulem a atividade do NO e do TNF-α podem ter considerável valor terapêutico, em particular aqueles capazes de reduzir a sua formação, podem ser benéficos em estados patofisiológicos decorrentes da produção excessiva desses mediadores.

Dentre as substâncias naturais que apresentam potencial imunomodulador têm-se os polissacarídeos, vitaminas, minerais e compostos indólicos, como a melanina (WILLIANS, 2001). MIMURA (1987) mostrou que o pigmento melanina extraído de *Ommastrephes bartramioque* apresenta atividade antiinflamatória, pois

suprimiu o edema na pata de rato induzido por carragenina, diminuiu a permeabilidade vascular causada por xileno e inibiu a migração de leucócitos.

Durante o desenvolvimento de um fármaco, vários estudos pré-clínicos e clínicos são realizados através de bioensaios fármaco-toxicológicos *in vitro* e *in vivo*, visando determinar o grau de eficácia, aplicabilidade terapêutica e segurança, visto que todas as substâncias também têm potencial para causar efeitos indesejáveis (KLAASSEN, 2003; SIMÕES et al., 1999). Resultados positivos em relação à mutagenicidade e carcinogenicidade sugerem que eles sejam descartados antes mesmo que os benefícios para aplicação terapêutica sejam adequadamente avaliados.

A toxicologia farmacológica avalia, através de estudos de toxicidade aguda, subaguda, crônica e acumulativa, os efeitos adversos de um fármaco durante os tratamentos, além de identificar estruturas e funções celulares alteradas (SILVA, 2002). Substâncias com atividade farmacológica reconhecida são submetidas a testes de citotoxicidade visando o conhecimento dos possíveis efeitos adversos, os quais são biologicamente distintos do terapêutico. Inúmeros exemplos são conhecidos onde o fármaco administrado, denominado de pró-fármaco, é um produto inativo e que *in vivo* é convertido na forma farmacologicamente ativa. VARANDA et al. (1997) demonstraram que as paepalantinas (isocumarinas) podem facilmente reagir durante a biotransformação produzindo metabólitos oxidativos citotóxicos. Assim, na terapêutica, é de extrema importância a avaliação da biotransformação de substâncias químicas em seus metabólitos e análise de seus efeitos antes de serem administrados *in vivo* (RANG; DALE; RITTER, 2003). Sistemas de ativação metabólica *in vitro* vêm sendo utilizados para demonstrar se um determinado composto necessita ser metabolizado para tornar-se tóxico ou se possui ação direta sobre componentes celulares na sua forma original. O sistema composto por fração microssomal S_9 e cofatores são amplamente empregados na biotransformação de substâncias químicas e posterior análise do seu potencial tóxico (BARILE, 1994; LEVI, 1994).

Na avaliação da mutagenicidade de produtos químicos vêm sendo utilizadas técnicas com linhagens bacterianas. O teste de Ames (*Salmonella/Mammaliam Microssome Mutagenesis Assay*) foi o primeiro ensaio descrito para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de substâncias químicas. Esse teste avalia a capacidade de determinados agentes induzirem mutação gênica em diferentes

linhagens de *Salmonella typhimurium.* Alguns produtos químicos também necessitam ser metabolizados *in vivo* para que seus derivados apresentem atividade mutagênica. Sistemas de ativação metabólica, como nos ensaios de citotoxicidade, são comumente utilizados para realização de testes *in vitro*, revelando se o composto necessita ser metabolizado para tornar-se mutagênico (mutágeno indireto) (MARON; AMES, 1983).

Nos últimos anos, têm sido freqüente o uso de metabólitos primários ou secundários de microorganismos na formulação de medicamentos, cosméticos e preparações de produtos de higiene pessoal, como uma opção mais viável do ponto de vista econômico. Melaninas estão sendo utilizadas em cosméticos como componente fotoprotetor, minimizando os efeitos lesivos teciduais causados pela radiação UV, isso devido a sua capacidade de neutralizar oxidantes biológicos e impedir a peroxidação lipídica em membranas biológicas. Entre as formulações cosméticas estão incluídos, bloqueadores solares, bronzeadores (na forma de cremes ou loções), perfumes, condicionadores, shampoos, batons e hidrantes labiais. Em perfumes, a melanina também pode atuar diminuindo a oxidação de outros componentes da fórmula e fornecendo uma coloração atrativa. Em batons e hidratantes labiais, a melanina atuaria contra a infecção pelo vírus *Herpes simplex*. Em shampoos e condicionadores, a melanina pode fornecer pigmentação e para isso as formulações apresentam geralmente um composto de amônio quaternário que auxilia na sua penetração no cabelo, juntamente com um pH básico que pode variar de 7 a 9 (HONDA; TAKEKOSHI; ARAI, 1995; KALKA et al., 2000).

Também foi demonstrado que melaninas derivadas de ácido caféico, que apresentam-se solúveis em solventes aquosos, podem ser usadas em baixas concentrações em formulações cosméticas devido a sua capacidade de reduzir inflamação/irritação causada por outros componentes de formulações, como a diidroxiacetona e/ou surfactantes. Nestas formulações, a melanina na forma de um pó ultrafino, pode ser utilizada em concentrações preferenciais que variam de 2 a 20% do peso total da composição (CHEETHAN; TAYLOR, 2007).

Tem sido relatado o uso de melaninas solúveis, em filmes plásticos sólidos contendo a mistura polivinil-álcool, que em associação com outros plásticos são usados na fabricação de lentes de óculos, por proteger contra danos causados pela radiação eletromagnética (GALLAS; EISNER, 2003).

Melaninas sintéticas têm sido preparadas na forma de suspensões, soluções ou em polímeros apropriados, e são dispersos na atmosfera em altitudes que variam de 35.000 a 45.000 pés, com objetivo de neutralizar as radiações UVA, UVB e UVC. Estas melaninas são encontradas em pequenas partículas ou em vesículas do tipo lipossomas, no qual o tamanho varia de 0,5 a 100 micrômetros, e permanecem por um longo período de tempo na atmosfera (BERLINER; LEONG, 1993).

Levando-se em conta todas as informações obtidas anteriormente, consideramos que um estudo da estrutura e da atividade biológica da melanina presente no fungo *Aspergillus nidulans* é de fundamental importância para uma futura aplicação prática deste pigmento.

2 - OBJETIVOS

Tendo em vista o possível potencial farmacológico do pigmento melanina extraído do mutante MEL1 do fungo *A. nidulans*, este trabalho tem como objetivos:

Obtenção do pigmento melanina puro;

Caracterização estrutural do pigmento utilizando as técnicas de espectrometria de massas (EM) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR);

Análise das atividades biológicas do pigmento, em relação a:

a) atividade citotóxica na ausência e na presença da fração S9;
b) atividade mutagênica na ausência e na presença da fração S9;
c) atividade antimicrobiana;
d) atividade antioxidante;
e) atividade imunomoduladora.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microorganismo

O presente estudo foi realizado com a linhagem mutante do fungo *A. nidulans*, denominada MEL1, a qual apresenta auxotrofia para inositol (*inoB1*) e produção aumentada do pigmento melanina (*melC1)* isolada por POMBEIRO (1991). A linhagem está estocada no Laboratório de Fungos Filamentosos no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química, Campus de Araraquara (UNESP). As soluções e reagentes utilizados nos ensaios descritos a seguir estão descritos no Apêndice 1.

3.2 Cultivo do Microorganismo

Para realizar o cultivo do microorganismo do meio líquido, primeiramente os conídios provenientes do crescimento da linhagem MEL1 em meio mínimo sólido por 4 dias a 37°C foram coletados em solução salina 0,85%, e em seguida filtrados em lã de vidro. O número de conídios por mililitro foi estimado através da câmara de Neubauer sob microscópio óptico.

Cerca de 2 x 10^8 conídios foram inoculados em 200 mL de meio mínimo líquido (Apêndice 1), suplementado com glicose (55 mM) e nitrato de sódio (70 mM), respectivamente como fonte de carbono e nitrogênio, e inositol (20 µg/mL) como requerimento nutricional necessário para o crescimento da linhagem. Após crescimento por 72 horas a 37ºC sob agitação de 250 rpm, as culturas foram submetidas à filtração para separação da massa micelial. A massa micelial foi desprezada e no meio de cultura foi realizada a extração da melanina.

3.3 Extração e purificação do pigmento

A extração da melanina presente no meio de cultura foi feita seguindo o método descrito por PAIM et al. (1989) com algumas modificações (Figura 7). Foi realizado inicialmente a precipitação do pigmento com ácido clorídrico 7 M, já que este pigmento apresenta-se insolúvel em soluções ácidas. O precipitado obtido após centrifugação foi lavado com água destilada e posteriormente submetido à hidrólise ácida utilizando ácido clorídrico 7 M e fenol 5% em atmosfera de nitrogênio, por 7 dias, para a retirada de carboidratos e proteínas (SAVA et al. 2001).

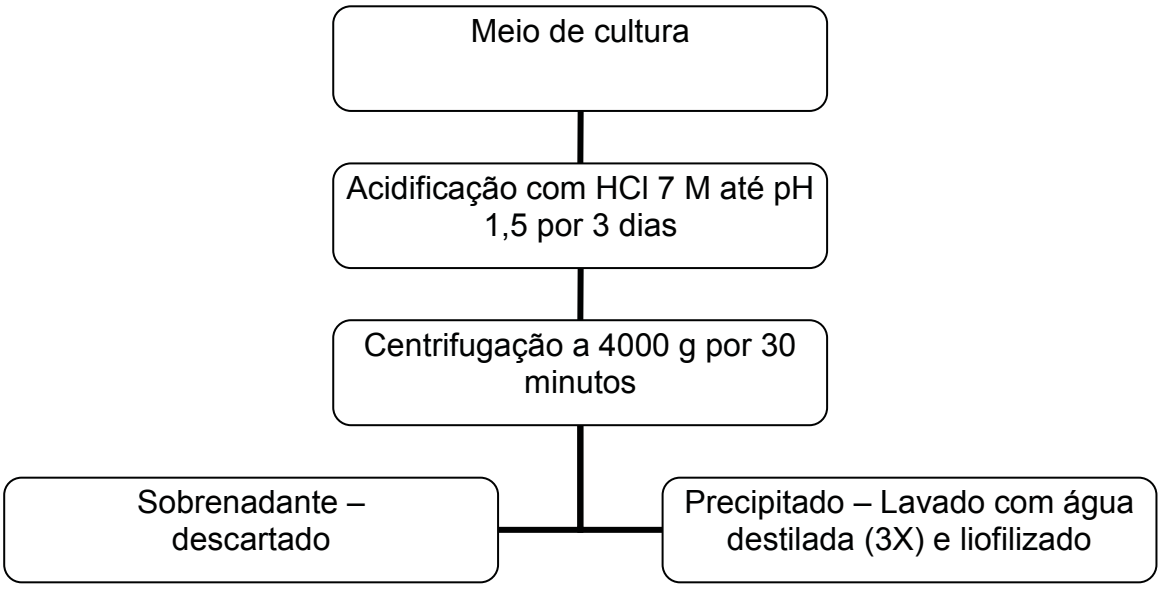


Figura 7 - Etapas de extração da melanina extracelular.

Após a hidrólise, o pigmento foi lavado com clorofórmio, éter etílico e etanol, conforme descrito por Sava et al. (2001) com algumas modificações, para a retirada de lipíd1os, seguido de lavagens em água destilada estéril e posterior liofilização.

A melanina sintética (Sigma ref.: M-8631) foi utilizada como referência.

3.4 Análise cromatográfica da melanina

Após a obtenção do pigmento do mutante MEL1 foi realizada uma análise cromatográfica em camada delgada para determinação de unidades pirrólicas, seguindo o método descrito por ITO, FUJITA (1985), com algumas modificações. A amostra de melanina do fungo e a melanina sintética usada como padrão foram submetidas à oxidação por permanganato de potássio em meio ácido e depois foram diluídas em metanol/água (Milli-Q) na proporção 90:10 (v/v) e aplicadas na placa de Sílica Gel IB-F Baker Flex (ref. 4463-04) com auxílio de capilar. A fase móvel utilizada continha metanol e tampão fosfato pH 7,0 na proporção 80:20 (v/v).

3.5 Análise espectrométrica de infravermelho da melanina

A melanina do mutante MEL1 foi submetida à análise espectrométrica de infravermelho antes e depois do procedimento de hidrólise. As amostras foram preparadas uniformemente em pastilhas de KBr, em uma mistura de 2 mg de amostra para 20mg de grade espectrométrica de KBr, usando as devidas precauções para eliminar as interferências da mistura, sendo mantidas em dessecador a vácuo antes do uso. As análises foram feitas variando o número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} em espectrômetro Nicolet Impact 400.

3.6 Análise da melanina por espectrometria de massas

A melanina do mutante MEL1 e a melanina sintética foram submetidas à espectrometria de massas com ionização por "electrospray" (ESI-MS), operando em modo positivo em alta resolução em aparelho ultrOTOF$_Q$ ESI-TOF Mass Spectrometer (Fabricante: Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). As amostras foram preparadas em temperatura ambiente em metanol/água (Milli-Q) na proporção 90:10 (v/v). Na análise foi utilizada uma bomba de infusão com fluxo de 80 µL/h. Após a obtenção dos espectros, foi feita a análise por ESI-MS/MS utilizando diferentes energias de colisão, dependendo do fragmento obtido.

Antes de realizar as análises foi feita uma calibração interna do aparelho com uma solução de NA-TFA a 10mg/ml e uma calibração externa com uma solução de formiato de sódio à 10 mM.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto.

3.7 Análise da melanina por ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A análise de ressonância paramagnética eletrônica foi realizada em aparelho BRUKER mod. Ellexys – E580 operando em banda X em temperatura ambiente na freqüência de 9,4 GHz com modulação de 100 kHz. Esta análise foi realizada no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP), campus de São Carlos, com a supervisão do grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas".

A partir dos resultados obtidos foi calculado o fator *g* (posição absoluta do campo magnético em um espectro de EPR), usando a fórmula descrita abaixo:

$$h\nu = g\beta H_0$$

h = constante de Planck

ν = freqüência (GHz)

β = Bohr magneton

H_0 = campo magnético no qual ocorre o centro da linha a ser calculada (Kgauss)

Quando ν é expresso em GHz e H_0 em Kgauss, o valor de h/β é igual a 0,71444.

3.8 Determinação da citotoxicidade basal *in vitro* da melanina

Neste teste foi usada a técnica do corante vermelho neutro (3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazina hidroclorido), um corante catiônico fraco que rapidamente penetra nas membranas celulares por difusão e acumula-se intracelularmente nos lisossomos. Este corante se acumula apenas nos lisossomos das células viáveis, portanto qualquer alteração causada por agente químico ou físico, que possa levar à morte celular acarretará uma menor penetração do corante no interior da célula que será detectada através de uma diminuição absorbância em 540 nm (BABICH; BORENFREUND, 1990; BOREUNFREND; PUERNER, 1985).

No ensaio, 6 x 10^4 células McCoy (linhagem de fibroblastos ATCC CRL-1696b)/mL, preparadas em meio Eagle, foram distribuídas em microplaca e incubada por 24 horas a 35-37ºC. Posteriormente, o meio foi removido e foram adicionadas diferentes concentrações da melanina extraída do mutante MEL1 e de melanina sintética (500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL). Após incubação por 24 horas, 200 µL de solução de vermelho neutro diluída em meio Eagle sem soro (50 µg/mL) foram adicionados ao crescimento celular. Após 3 horas a 35-37ºC, a placa foi vertida e cerca de 200 µL de uma mistura ácido acético-etanol foram adicionados a cada orifício. A leitura da absorbância foi realizada em Espectrofotômetro multicanal Spectra & Rainbow Readers da Tecan Austria, em comprimento de onda de 540 nm com filtro de referência 620 nm. Os testes foram acompanhados de crescimento controle (sem a adição da substância em estudo) realizados em triplicata e repetidos no mínimo 3 vezes (DEVIENNE et al., 2002).

A influência da ativação metabólica também foi ensaiada. Neste ensaio, 6 x 10^4 células/mL foram inoculados em microplacas e incubadas a 37ºC para fornecer cerca de 60 a 70% de confluência. Após 24 horas, o meio foi removido e as

células foram tratadas com diferentes concentrações (500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL) da melanina do mutante e melanina sintética previamente submetidas a ativação metabólica. Esta ativação foi feita em um sistema composto por 4% de fração S_9 de fígado de rato tratado com Aroclor 1254, 1% de solução de cloreto de magnésio 0,4 M, 1% solução cloreto de potássio 1,65 M, 0,5% de D-glicose-6-fosfato 1M, 4% de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M, 50% de tampão fosfato 0,2 M pH 7,1 e 39,5% de água destilada estéril. Após incubação por 24 horas, o meio foi removido e a placa tratada para o teste do Vermelho Neutro. Os ensaios foram acompanhados de crescimento celular controle (sem a substância teste), crescimento celular na presença de S9, crescimento celular na presença de DMSO e crescimento celular com ciclofosfamida (controle da reação de metabolização). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, 3 vezes.

A determinação do índice citotóxico (IC_{50}), concentração do agente que reduz em 50% a absorbância espectrofotométrica foi feita através de análise de regressão linear da curva dose-resposta obtida.

3.9 Avaliação da morfologia das células McCoy na presença de melanina

No ensaio, 6 x 10^4 células McCoy/mL, preparadas em meio Eagle, foram distribuídas em lamínulas e incubada por 24 horas a 35-37ºC. Posteriormente, o meio foi removido e foi adicionada a melanina em concentração de 250 µg/mL (preparada conforme descrito no item 8.1). Após incubação por 24 horas, as células foram coradas usando os corantes de May-Grunwald e Giemsa. Nesta coloração, a lamínula foi coberta com uma solução contendo 5 mL do corante de May-Grünwald (solução-mãe) e 5 mL de tampão de Sorensen durante 5 minutos. Após este período, a lamínula foi lavada com uma mistura contendo 5 mL de solução de Giemsa e 10 mL de tampão de Sorensen, permanecendo em repouso durante 15 minutos, para posteriormente ser lavada com água destilada. Estas foram observadas em microscópio óptico e comparadas com células McCoy na ausência de melanina (controle negativo).

3.10 Determinação da atividade mutagênica *in vitro* da melanina

O ensaio de mutação gênica reversa utilizado nesse trabalho foi o Teste de Ames que se baseia na utilização de linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina, as quais revertem à prototrofia pelo tratamento com agentes mutagênicos (MAROON, AMES, 1983). Neste estudo foram utilizadas as linhagens:

- TA98: apresenta mutação no gene D (hisD3052), e detecta compostos mutagênicos que deslocam o quadro de leitura do DNA.
- TA100: apresenta mutação his G46, e detecta agentes que causam substituições, principalmente em pares G-C.
- TA102: contém a mutação no gene his G428, detectando agentes químicos e radiações, além de agentes *cross-link*.
- TA97a: detecta mutágenos do tipo *frameshift*, apresentando mutação no gene hisD6610.

As linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 102 foram inoculadas em 30 mL de caldo nutriente, os quais foram incubados à 37ºC por 14 horas, sob agitação, até obtenção de 1 a 2 x 10^9 células/mL. Diferentes concentrações da melanina extraída do fungo *A. nidulans* (1 mg/placa, 500, 250 e 125 μg/placa) e 100 μL de cultura bacteriana foram adicionadas a 2 mL de Top agar, homogeneizados e vertidos sobre placas de Petri contendo agar mínimo seletivo. Após solidificação do Top agar, as placas foram incubadas a 37ºC. Após 48 horas, colônias histidina positiva foram contadas manualmente. A influência da ativação metabólica na melanina do fungo *A. nidulans* foi testada sobre as mesmas linhagens de *S. typhimurium*, através da adição de 500 μL de fração microssomal S9 (proveniente de fígado de ratos induzidos com arocloror 1254) ao Top agar, seguindo a metodologia descrita acima. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes para os ensaios sem ativação metabólica. Cada experimento foi acompanhado de crescimento espontâneo, crescimento com DMSO (controle negativo) e crescimento na presença da fração S_9 (quando necessário). Para controle positivo de mutagenicidade foram utilizadas as substâncias apresentadas na tabela 1.

Os dados da mutagenicidade foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedidio pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA. Esse programa permite avaliar o

efeito dose-resposta através do cálculo de análise de variância (ANOVA) entre as médias do número de rervertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear.

Tabela 1 – Relações das substâncias mutagênicas utilizadas como controle positivo.

Linhagem	*Mutágeno padrão*
TA 97a/-S_9	NPD = 4-o-nitrofenilenodiamina (10 μg/placa)
TA 97a/+S_9	ANTR = 2-antramino (3 μg/placa)
TA 100 / -S_9	AS = azida sódica (2,5 μg/placa)
TA 100 / +S_9	ANTR = 2-antramino (3 μg/placa)
TA 98 / -S_9	NPD = 4-o-nitrofenilenodiamina (10 μg/placa)
TA 98 / +S_9	ANTR = 2-antramino (3 μg/placa)
TA 102 / -S_9	MITC = Mitomicina C (3 μg/placa)
TA 102 / +S_9	AF = 2-aminofluoreno (10 μg/placa)

A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM), que é a razão entre a média do número de revertentes por placa teste (espontâneos e induzidos) e a média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos). Uma substância é considerada mutagênica quando a razão de mutagenicidade (RM) for maior ou igual a 2, em pelo menos uma das doses testadas, e houver uma relação dose-resposta entre as concentrações avaliadas e o número de revertentes induzidos. (VALENT, 1993; VARGAS et al., 1993).

3.11 Determinação da atividade antimicrobiana da melanina

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano, foi realizada através da técnica espectrofotométrica de microdiluição (DEVIENNE, RADDI, 2002). A CIM foi determinada através da relação direta entre a absorbância do crescimento bacteriano e concentração da substância teste.

Primeiramente foi realizado o cultivo dos microganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25913, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541 em placas contendo Agar sangue de carneiro 5% e de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Agar McConkey. Após 24hs de incubação a 37ºC, as colônias foram repicadas para tubos contendo meio

de crescimento e incubados durante a noite. Uma alíquota dessa cultura foi semeada no mesmo meio e incubado a 37ºC até turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland para obtenção de crescimento em fase exponencial.

Para avaliar a atividade antimicrobiana, orifícios de microplacas foram preenchidos com 100 µL de meio de crescimento, contendo concentrações variadas da substância teste (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL), sobre os quais foram adicionados 100 µL de cultura dos diferentes microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli e Enterococcus faecalis*) em fase de crescimento exponencial. As placas foram submetidas à leitura espectrofotométrica em 620 nm. Após incubação a 35-37ºC por 24 horas, as mesmas foram homogeneizadas e nova leitura realizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os testes foram realizados em triplicata e acompanhados de crescimento controle. A primeira leitura espectrofotométrica foi realizada para eliminar a coloração de fundo, dessa maneira somente o crescimento bacteriano foi computado nos experimentos. Um branco da reação foi realizado com melanina diluída em meio de crescimento nas mesmas concentrações do teste para descontar a sua absorbância em 620 nm.

3.12 Avaliação da atividade antioxidante da melanina

3.12.1 Teste do DPPH

O ensaio espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) é um teste que permite fazer uma avaliação indireta da capacidade antioxidante da substância em análise. O DPPH apresenta coloração violeta, tendo assim uma absorção em 540 nm, quando se encontra reduzido torna-se amarelo não sendo absorvido neste comprimento de onda. Esta redução é devida à ação de algumas substâncias capazes de doar hidrogênio radicalar ao DPPH, formando assim um radical estável, o qual está associado à propriedade antioxidante (FENGLIN et al., 2003). Neste ensaio espectrofotométrico utilizou-se 100 µL de uma solução de DPPH (1,1 – difenil-2-picril-hidrazila) em metanol (0,004%), adicionado de 50µL das melaninas em diversas concentrações (6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL em DMSO), e após 30 minutos de reação foi determinada a absorbância em 540 nm. Como referência de máxima absorção foi utilizada a leitura obtida com 100µL da solução de DPPH adicionado de 50µL de DMSO. A partir dos valores das absorbâncias obtidos foi calculada a porcentagem de decaimento da absorbância utilizando a fórmula descrita abaixo.

$$\%\Delta = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

$\%\Delta$ = porcentagem de decaimento da absorbância
A_0 = absorbância do DPPH sem a substância teste
A = absorbância verificada com a adição da substância teste

Os resultados da porcentagem de decaimento da absorbância foi plotado em um gráfico versus a concentração da amostra. Deste gráfico foi obtido o valor do IC_{50} (a concentração da amostra requerida para capturar 50% do radical livre). Neste teste, foi usado Trolox como substância controle de efeito antioxidante comprovado. Um branco da reação foi preparado com melanina diluída em DMSO nas diversas concentrações para descontar possíveis interferências em 540 nm.

3.12.2 Análise do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Neste ensaio o H_2O_2 é quebrado pela peroxidase gerando um intermediário que oxida o vermelho de fenol a um composto amarelo que em pH básico se torna vermelho púrpura, podendo ser quantificado em 610 nm (PICK, KEISARI, 1980). A diminuição da absorbância deste sistema indica neutralização do H_2O_2 pelas substâncias em estudo. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata em um volume final de 1 mL da mistura de reação contendo diferentes concentrações de pigmento e da melanina sintética (25, 50, 75, 100, 150 e 200 µg/mL), enzima peroxidase (8,5 U/mL), vermelho de fenol (0,1mg/mL) e H_2O_2 (20 µM), completado com tampão fosfato (NaCl 140 mM, fosfato de potássio 10 mM e dextrose 5,5 mM), pH 7. Esta misutra foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e a reação foi terminada pela adição de 100 µL de NaOH 1N. O complexo púrpura do vermelho de fenol oxidado foi quantificado em 610 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU530 e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de H_2O_2, utilizando a fórmula descrita no teste de DPPH. Neste teste, foi usado Trolox como

substância controle de efeito antioxidante comprovado, e foi preparado o branco da reação na presença de amostra e todos os reagentes na ausência de peroxidase.

3.12.3 Ensaio da deoxirribose

O ensaio da deoxirribose descrito por HALLIWELL, GUTTERIDGE, ARUOMA (1987) com algumas modificações, consiste na degradação do açúcar deoxirribose quando exposto ao radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) gerado por reação de Haber-Weiss. Este sistema resulta na formação do malonaldeído (MDA) que pode ser detectado pela habilidade de reagir com ácido tiobarbitúrico formando um cromógeno rosa. A diminuição na intensidade do cromógeno, medida pela absorbância em 532 nm, evidencia a inibição dos radicais hidroxil ($OH^{\bullet}$).

A mistura de reação em um volume final de 1,2 mL continha os seguintes reagentes: deoxirribose (2,8 mM), $FeCl_3$ (25 µM), EDTA (100 µM), H_2O_2 (2,8 mM), tampão KH_2PO_4/KOH 10 mM pH 7,4, ascorbato (100 µM) e melanina do mutante ou melanina sintética em várias concentrações (25, 50, 75, 100, 150 e 200 µg/mL). A formação de radical hidroxil ocorre após incubação da mistura de reação a 37ºC por 1 hora. Após este tempo foram adicionados 1 mL de ácido tiobarbitúrico 1% preparado em NaOH 50 mM e 1 mL de ácido tricloroacético 2,8%. Esta mistura, após ser aquecida por 5 minutos, desenvolveu o cromógeno rosa, que foi quantificado em 532 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da formação de radical hidroxil, calculado como descrito no teste de DPPH. Nesta reação, Trolox foi utilizado como substância antioxidante controle, e foi feito o branco da reação contendo amostra e os reagentes da mistura reacional na ausência de deoxirribose.

3.12.4 Atividade quelante de Fe^{2+}

Neste ensaio a presença de um agente quelante interrompe a formação do complexo entre o íon Fe^{2+} e o composto ferrozine, resultando na diminuição da coloração vermelha, o qual pode ser evidenciado pela diminuição da absorbância em 562 nm (GÜLÇIN, 2006). O experimento foi realizado pela mistura de 0,4 mL de diferentes concentrações de pigmento do mutante ou melanina sintética (25, 50, 75, 100, 150 e 200 µg/mL em etanol) e 0,05 mL de $FeCl_2$ (2 mM). A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL de Ferrozine 5 mM e o volume total foi ajustado a 4 mL com

etanol. Esta mistura foi agitada vigorosamente e mantida por 10 minutos em temperatura ambiente. A absorbância em 562 nm foi determinada em espectrofotômetro BECKMAN DU 530. A porcentagem de inibição da formação do complexo Fe^{2+}-ferrozine foi calculada como descrito no teste do DPPH. A substância controle utilizada foi o EDTA, e o branco da reação foi preparado com pigmento diluído nas diversas concentrações em etanol.

3.12.5 Reação com ânion superóxido

A mistura de hipoxantina e xantina oxidase em pH 7,4 geram radical superóxido, o qual pode ser detectado pela habilidade de reduzir Nitro Blue Tetrazólio (NBT). A geração do ânion superóxido foi realizado em um volume final de 3 mL contendo 0,1 mL de hipoxantina (30 mM) (dissolvido em solução de hidróxido de potássio 1%), 0,1 mL de EDTA (0,3 mM), 0,1 mL de NBT (3 mM), 0,1 mL de da melanina do mutante e melanina sintética em concentrações de 50, 75, 100, 150 e 200 µg/mL e tampão KH_2PO_4-KOH pH 7,4 (concentração final de 88 mM). A reação foi iniciada pela adição de 0,3 mL de xantina-oxidase (0,04 UI/mL). Os efeitos da melanina foram avaliados através da redução do NBT medido em 560 nm (MARSHALL et al., 1996). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da formação de ânion superóxido e foi calculado como descrito no teste de DPPH. Nesta reação Trolox foi utilizado como substância antioxidante controle. Foi feito o branco da reação contendo amostra e os reagentes da mistura reacional na ausência de deoxirribose.

3.12.6 Ensaio da atividade da xantina-oxidase

Este método espectrofotométrico, descrito por MASUOKA et al. (2006), foi usado para avaliar a inibição da xantina oxidase pela substância teste, em função da diminuição da formação de ácido úrico. A mistura de reação em um volume final de 3 mL continha xantina como substrato (concentração final de 100 µM) e 0,06 mL de melanina do mutante e melanina sintética em concentrações de 50, 75, 100, 150 e 200 µg/mL, ambos dissolvidos em tampão Na_2CO_3 40 mM contendo 0,1 mM de EDTA pH 10. A reação foi iniciada pela adição de 0,04 unidades de xantina oxidase e completada a 25ºC após 5 minutos. A concentração de ácido úrico formado foi determinada através da absorbância em 293 nm e a porcentagem de inibição

calculada como descrito no teste do DPPH. O branco da reação a mistura reacional na ausência de xantina oxidase e o pigmento nas diversas concentrações.

3.13 Avaliação da resposta imunológica na presença de melanina

3.13.1 Obtenção de macrófagos peritoneais

Para análise do fator de necrose tumoral (TNF-α) e óxido nítrico (NO) foi utilizada uma cultura de macrófagos, os quais foram extraídos da cavidade peritoneal de camundongos. Esta cultura foi obtida após injeção intraperitonial de 3 mL de caldo tioglicolato estéril e após 3-4 dias, as células foram coletadas pela injeção de 5 mL de tampão PBS pH 7,0 (BARILE, 1994 - modificado). Após 3 lavagens com 10 mL de tampão PBS as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 para a realização do teste de detecção de TNF-α e NO. Em todos os testes foi determinado a viabilidade dos macrófagos na presença da substância em estudo através da técnica do vermelho neutro (VN). No teste de viabilidade, 200 µL de solução de vermelho neutro foram adicionados ao crescimento celular e incubados a 35-37ºC, por 3 horas. Após esse período, a placa foi vertida e cerca de 200 µL de uma mistura ácido acético–etanol (1:50) foram adicionados a cada orifício. A leitura da absorbância foi realizada em Espectrofotômetro multicanal em comprimento de onda de 540nm com filtro de referência 620 nm (BORENFRUND, PUERNER, 1985). O controle de estimulação imunológica foi o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). Todos os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, 3 vezes.

3.13.2 Avaliação do processo de fagocitose na presença de melanina

Neste ensaio, foram adicionados uma cultura de macrófagos, contendo 1,5 x 10^6 células /mL preparados em meio RPMI, em lamínulas acondicionadas em microplacas. As lamínulas contendo as células foram incubadas por 30 minutos a 37ºC em estufa de CO_2, e posteriormente lavadas três vezes com Solução de Hanks. A melanina foi preparada na concentração de 250 µg/mL em meio RPMI, e adicionado 0,1 mL a cada lamínula, seguido por incubação por 90 minutos a 37ºC em estufa contendo 5% de CO_2. Após este período, as lamínulas foram lavadas com o próprio meio (3 vezes), foram fixadas com metanol durante 30 minutos e coradas utilizando a coloração de May-Grünwald e Giemsa (descrito no ítem 10). Para este

ensaio foram preparadas 10 lamínulas utilizando 5 animais e foi realizado um controle de negativo (células na ausência de melanina).

3.13.3 Teste para detecção da produção de fator de necrose tumoral (TNF-α)

Neste ensaio aproximadamente 1,5 mL da cultura de macrófagos, contendo 5 x 10^6 células /mL foram adicionados em microplaca de 24 cavidades e incubada a 37ºC em estufa contendo 5% de CO_2. Após 1 hora, a placa foi vertida para retirada do sobrenadante e foram adicionados 1,5 mL de meio RPMI e 50 μL de diferentes concentrações da melanina do mutante MEL1 (50, 100 e 200 μg/mL). Após 24 horas de incubação nas mesmas condições especificadas acima, o sobrenadante da cultura foi retirado e centrifugado a 10.000 g a 4ºC por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados 100 μL de actinomicina D e 100 μL do sobrenadante sobre o tapete de células L-929 (células de fibrosarcoma de murino sensível a TNF-α) previamente preparado (100 μL de células L-929 contendo 4 x 10^5 células/mL, incubação por 18 horas em atmosfera contendo 5% de CO_2) e novamente incubados a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2. Após 24 horas, a placa foi vertida e determinada a viabilidade celular com o teste do Vermelho Neutro descrito no item 12.1. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro multicanal em comprimento de onda de 540 nm com filtro de referência 620 nm. A quantidade de TNF-α produzido foi determinada através da viabilidade das células L-929. A atividade de TNF-α é expressa em U/mL, onde 50% de lise celular de L-929 correspondem a 1U dessa citocina (KIRIKAE et al, 1996). Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, com 4 animais. Os testes foram acompanhados de controle negativo (macrófagos e L-929 sem estímulo), controle positivo (estimulação imunológica com LPS) e a viabilidade celular pós-experimentos determinada através da técnica do vermelho neutro.

3.13.4 Teste para a detecção da produção de Óxido Nítrico (NO)

Neste ensaio, uma suspensão de macrófagos peritoneais contendo 5 x 10^6 células/mL em RPMI foram inoculados em microplaca, a qual foi incubada por 24 horas a 37ºC em atmosfera contendo 5% CO_2. Após esse período, foram

adicionados 100 μL de diferentes concentrações da melanina do mutante (50, 100 e 200 μg/mL) aos orifícios e a placa reincubada nas mesmas condições. Alíquotas de 50 μL do sobrenadante de cada orifício foram transferidas para uma nova microplaca sobre as quais foram adicionados 50 μL de reagente de Griess. A absorbância foi determinada após 15 minutos, em comprimento de onda de 540 nm (GREEN et al., 1982; FEDER, LASKIN, 1994; LASKIN et al., 1994). A quantidade de óxido nítrico foi expressa em μmol de nitrito/5x10^5 células e foi determinada a partir da equação da reta obtida da curva padrão. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, com 3 animais. Os ensaios foram acompanhados de controle negativo (macrófagos sem estímulo ou tratamento), de controle positivo (estimulação imunológica com LPS), controle da viabilidade de celular pós-experimentos através da técnica do vermelho neutro (descrito no item 3.13.1), e branco da reação com a amostra preparada nas diversas concentrações em meio RPMI na ausência de células.

3.13.5 Teste de inibição na produção de TNF-α

Foi utilizada a suspensão de macrófagos peritoneais (na concentração de 5x10^6 células/mL) preparada como descrito no item 12.1. Após a aderência, os macrófagos foram incubados na presença de 25 μL de solução de LPS (1μg/mL) e 25 μL de cada concentração da melanina do mutante (50, 100 e 200 μg/mL). A incubação foi feita por 24 horas em estufa a 37ºC com suprimento constante de 5% de CO_2. Posteriormente ocorreu a centrifugação, e foram adicionados 100 μL do sobrenadante sobre o tapete de células L-929 (preparadas como descrito no item 12.2) e, novamente, incubados a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2. Após 24 horas, a placa foi vertida e determinada a viabilidade celular com a técnica do vermelho neutro como descrito no item 12.1. A quantidade de TNF-α produzido foi determinada através da viabilidade das células células L-929. A atividade de TNF-α é expressa em U/mL, onde 50% de lise celular de L-929 correspondem a 1U dessa citocina (KIRIKAE et al, 1996). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, com 3 animais.

3.13.6 Teste de inibição da liberação de óxido nítrico (NO)

Foram utilizados macrófagos na concentração de 5 x 10^6 células/mL. Após a aderência, os macrófagos foram incubados na presença de 100 µL de solução de LPS (1µg/mL) e 100 µL de cada concentração da melanina do fungo *A. nidulans* (50, 100 e 200 µg/mL). A incubação foi feita por 24 horas em estufa a 37ºC com tensão constante de 5% de CO_2. A produção de NO foi determinada espectrofotometricamente através do acúmulo de nitrito do meio de cultura com a utilização do reagente de Griess. A quantidade de óxido nítrico (µmol de nitrito) no sobrenadante foi determinada através equação da reta obtida da curva padrão. Os resultados foram expressos em micromoles de nitrito/5x10^5 células. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, com 3 animais. Os ensaios foram acompanhados de controle negativo (macrófagos sem estímulo ou tratamento), de controle positivo (estimulação imunológica com LPS), controle da viabilidade de celular pós-experimentos através da técnica do vermelho neutro (descrito no ítem 3.13.1), e branco da reação com a amostra preparada nas diversas concentrações em meio RPMI na ausência de células.

3.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada a fim de verificar a reprodutibilidade e validação dos resultados, através de técnicas de análise estatística de regressão, avaliando se o modelo de regressão linear é adequado para a compilação e significância dos resultados nos ensaios de citotoxicidade, e análise estatística de variância (ANOVA), para averiguar se ocorreu diferenças estatisticamente significativa dos resultados obtidos entre os padrões e o pigmento testado para os testes antioxidantes. Também foi utilizado ANOVA nos ensaios imunológicos comparando os resultados após tratamento com o pigmento com o controle negativo. O intervalo de confiança utilizado foi de 95% (α = 0,05) (LAPPONI, 1997).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização estrutural da melanina

4.1.1 Análise espectrométrica de Infravermelho da melanina

A espectroscopia de infravermelho tem sido empregada para estudar as peculiaridades estruturais de substâncias, como o pigmento melanina, por fornecer informações sobre os grupos funcionais presentes (BILINSKA, 1996; PAIM et al., 1990). No presente trabalho o método foi usado para verificar se ocorreram modificações estruturais na molécula após o processo de purificação da melanina extraída do fungo, pois este processo envolve prolongada hidrólise em ácidos aquosos para remover proteínas e carboidratos associados, alternando ciclos de solventes orgânicos e ácidos quentes, na tentativa de fornecer um material com maior grau de pureza (ELLIS: GRIFFITHS, 1974; PATEL et al., 1995; FOGARTY; TOBIN, 1996).

O perfil espectrométrico de infravermelho do pigmento obtido do mutante MEL1, na presença e na ausência do procedimento de hidrólise e da melanina sintética, está apresentado na figura 8. O espectro da melanina sem hidrólise mostra as seguintes características: uma banda larga na região entre 3400-3200 cm^{-1} representando deformações de estiramento dos grupos OH e/ou NH_2 (BONNER; DUNCAN, 1962); uma banda na região de 2930-2860 cm^{-1}, atribuída a deformações de estiramento dos grupos CH_2 e CH_3 (SENESI; MIANO; MARTIN, 1987; BRIDELLI; TAMPELLINI; ZECCA, 1999), que juntamente com as bandas em 1460-1450 cm^{-1} atribuídas a deformações angulares de grupos CH_2 e CH_3 indicam que o pigmento tem um alto conteúdo de grupos alifáticos; uma banda em 1030 cm^{-1}, devido a estiramento C-O, indicando a presença de polissacarídeos (PAIM et al., 1990); uma banda entre 1620 e 1650 cm^{-1} atribuída a deformações de estiramento de ligações C=C ou C=O (BONNER; DUNCAN, 1962); uma banda na região de 1720 cm^{-1} reconhecida como grupo COOH (carboxila), característico da estrutura de melaninas (SENESI; MIANO; MARTIN, 1987); uma banda na região de 2340 cm^{-1} que pode ser devido à presença de grupos NH_3^+ e $=NH_2^+$ de aminoácidos (SENESI; MIANO; MARTIN, 1987; PAIM et al., 1990).

Para a amostra de melanina do mutante MEL1 que passou pelo processo de hidrólise foram encontradas características semelhantes às anteriores, porém algumas bandas apresentam diferenças na intensidade. As bandas em 1620 e 1650 cm^{-1} atribuídas a ligações C=C ou C=O estão presentes antes e depois da hidrólise, e podem ser indicativo da presença de quinonas, que são grupos comuns na

estrutura de melaninas (BRIDELLI; TAMPELLINI; ZECCA, 1999). A diminuição na intensidade das bandas na região de 2930-2860 cm^{-1}, atribuída às deformações de estiramento dos grupos CH_2 e CH_3 (SENESI; MIANO; MARTIN, 1987; BRIDELLI; TAMPELLINI; ZECCA, 1999), e das bandas em 1460-1450 cm^{-1} atribuídas às deformações angulares de grupos CH_2 e CH_3, que indicam um menor conteúdo de grupamentos alifáticos, juntamente com a ausência da banda em 1030 cm¯1, sugerem uma diminuição na contaminação com carboidratos (SENESI; MIANO; MARTIN, 1987; PAIM et al., 1990; BRIDELLI; TAMPELLINI; ZECCA, 1999).

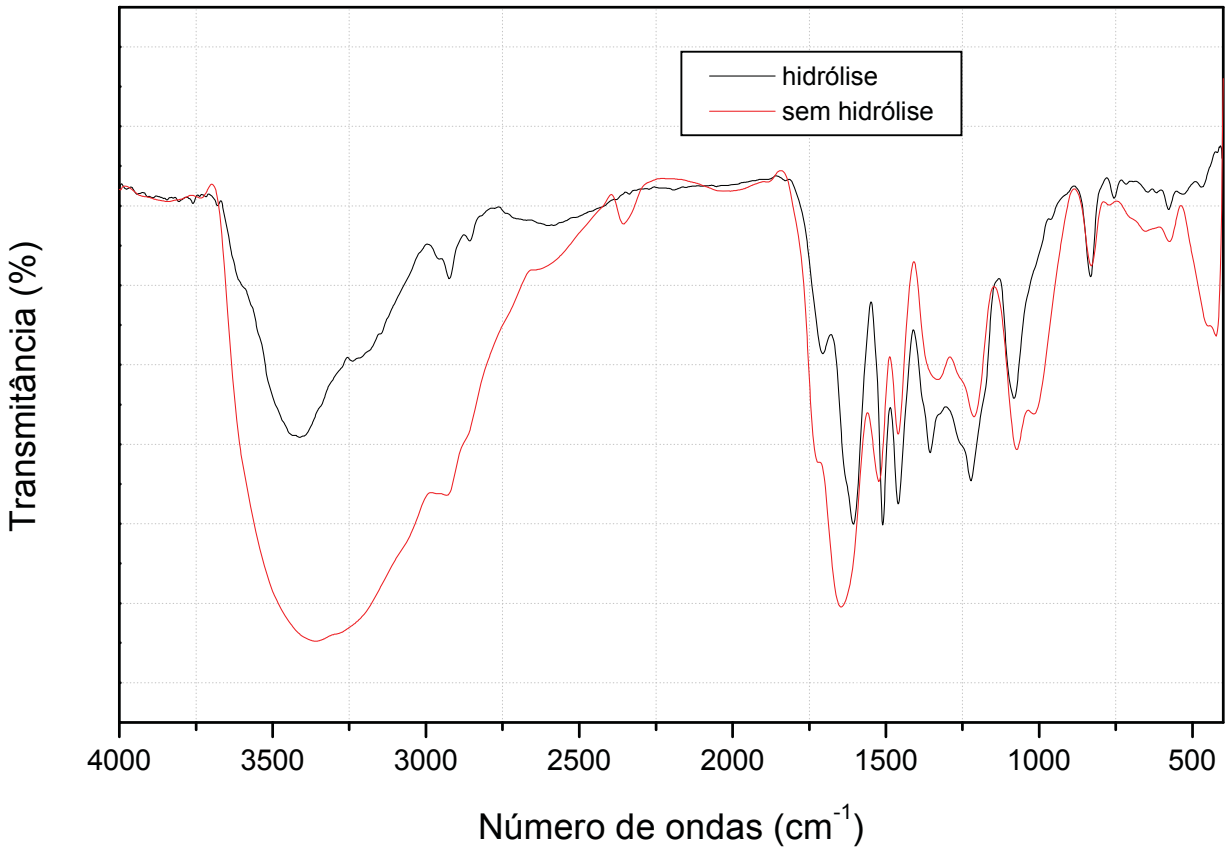


Figura 8 – Espectros de infravermelho da melanina obtida do mutante MEL1, submetida ou não ao processo de purificação por hidrólise.

A ausência da banda na região de 2340 cm^{-1}, que é atribuída à presença de grupos NH_3^+ e $=NH_2^+$ de aminoácidos, e a diminuição de intensidade da banda larga na região entre 3400-3200 cm^{-1} que representa deformações de estiramento dos

grupos OH e/ou NH_2, sugerem uma diminuição na contaminação com proteínas (SENESI; MIANO; MARTIN, 1987; PAIM et al., 1990), provavelmente devido à eficácia do método de purificação em retirar este tipo de contaminação.

Perfis espectrométricos semelhantes foram obtidos por SENESI, MIANO e MARTIN (1987), durante a análise de pigmentos obtidos de *Aspergillus glaucus*, *Eurotium echinulatum, Hendersonula toruloidea*, *Stachybotrys atra* e *Aspergillus sydowi,* após purificação por hidrólise ácida.

Os resultados obtidos, portanto, sugerem que o processo de hidrólise e purificação não alterou significativamente a estrutura da melanina e contribuiu para a retirada de contaminações, como proteínas e carboidratos, que poderiam interferir nos ensaios de atividade biológica.

4.1.2 Análise cromatográfica da melanina

Para auxiliar na identificação estrutural da melanina do mutante MEL1, foi realizada a cromatografia em camada delgada, uma vez que o sistema cromatográfico utilizado é capaz de evidenciar a presença de fragmentos de DOPA-melanina contendo unidades pirrólicas (ITO; FUJITA, 1985).

A placa cromatográfica, apresentada na figura 9, foi feita utilizando amostras de melanina do mutante MEL1 (M1) após hidrólise e da melanina sintética (S), usada como padrão. Os resultados mostram a presença de uma única mancha tanto para a melanina do fungo como para a melanina sintética, com um mesmo fator de retenção de 0,43. Estes resultados sugerem a presença de um mesmo fragmento pirrólico, indicando que as duas substâncias apresentam as mesmas características estruturais.

Figura 9 – Cromatografia em camada delgada da melanina extraída do mutante MEL1 (M1) e da melanina sintética (S).

4.1.3 Análise da melanina por espectrometria de massas

A caracterização estrutural do pigmento tipo melanina extraído do mutante MEL1, foi feita utilizando a técnica de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (*ESI*-MS). A ionização por *electrospray* é baseada na extração de íons em solução ou na formação desses íons sob a ação de um forte campo elétrico. O fato de gerar íons com altos pesos moleculares com cargas múltiplas que podem ser observados e analisados em espectrômetros de massas simples, torna esta técnica a mais amplamente utilizada para a análise de compostos polares, iônicos e não-voláteis (GASKELL, 1997). Considerando que aproximadamente 80 % de todos os

produtos naturais não são voláteis, fica evidente a importância dessa técnica de ionização (STREGE, 1999).

A natureza do solvente utilizado e o pH são igualmente importantes na geração dos íons na técnica de *ESI*-MS. Íons positivos são, geralmente, analisados empregando-se soluções da amostra em metanol e em baixo pH, e íons negativos, por sua vez, são produzidos, em maior proporção, a partir de soluções de clorofórmio com altos valores de pH (COLE, 1997). Outra orientação, é que substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas, e consequentemente, deveriam ser analisadas no modo negativo (CROTTI et al., 2006). Embora a melanina apresente, aparentemente, um grande número de grupos carboxílicos, a sua análise foi feita no modo positivo usando metanol como solvente, devido à dificuldade de dissolução em clorofórmio e à falta de reprodutibilidade no modo negativo.

Durante o processo de ionização, três tipos de íons podem ser gerados: íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas e moléculas cationizadas ou anionizadas. A extensão com que cada um destes íons é formado depende das reações ocorridas no interior dos capilares. Em compostos como a melanina, que apresentam grandes potenciais redox, geralmente ocorrem reações do tipo ácido-base e/ou coordenação com íons metálicos, principalmente Na^+ e K^+ (CROTTI et al., 2006). Os resultados obtidos com a melanina do mutante sugerem que todos os fragmentos gerados durante o experimento foram cationizados com Na^+.

O espectro obtido utilizando *ESI*-MS dos monômeros da melanina do mutante está apresentado na figura 10, e podemos observar cinco fragmentos importantes com *m/z* 573, 550, 522, 397 e 325 u (unidades de massa atômica). Devido ao fato destes resultados fornecerem informações pouco esclarecedoras sobre a estrutura e possíveis monômeros da melanina, foi realizada uma análise dos fragmentos “filhos” gerados através da técnica de espectrometria de massas seqüencial (*ESI*-MS/MS).

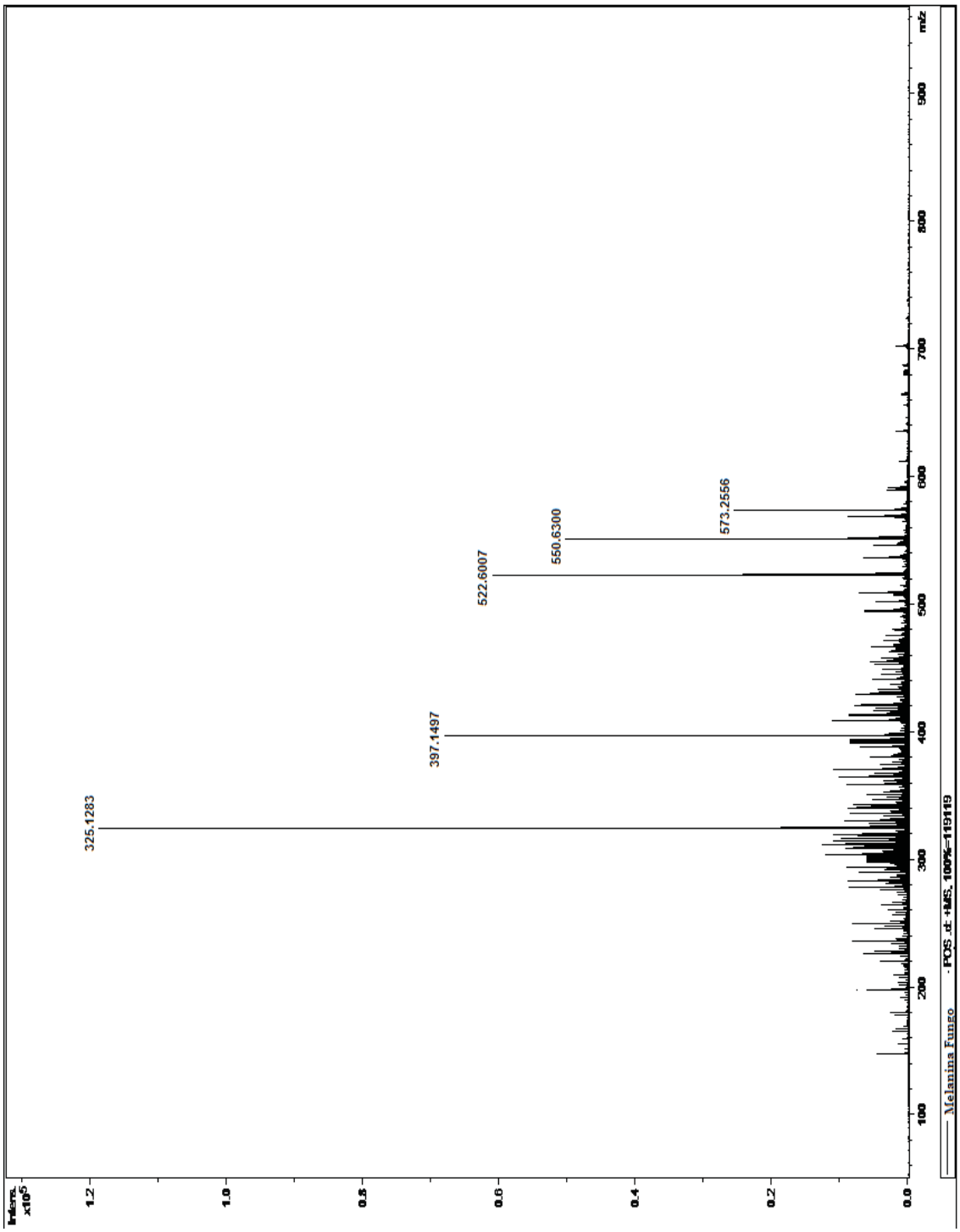


Figura 10 – Fragmentograma (*ESI*, modo positivo) da melanina do mutante MEL1.

O espectro de *ESI*-MS/MS do fragmento com *m/z* 573 u está apresentado na figura 11. Os resultados sugerem que o fragmento com *m/z* 573 u e seus fragmentos "filhos", com *m/z* 501 e 403 u, referem-se a íons cationizados $[M+Na]^+$, e, portanto, representam massa real de 550, 478 e 380 u, respectivamente. A estrutura proposta para este fragmento com *m/z* 573 u é composta de uma unidade pirrólica substituída que apresenta hiroxilas e um grupo cetoácido, um grupo 5,6-indolquinona-2-ácido carboxílico (IQCA) e uma unidade 5,6-didroxindol-2-ácido carboxílico (DHICA) (Figura 12). A união das unidades 5,6-diidroxindol-2-ácido carboxílico e 5,6-indolquinona-2-ácido carboxílico são feitos pelos grupos carboxílicos e pelo nitrogênio do anel indólico da indolquinona, como foi descrito anteriormente por PROTA (1996).

A presença do grupamento pirrólico substituído contendo hidroxilas e o grupo cetoácido no fragmento com *m/z* 573 u, foram confirmados devido à perda de fragmentos com massa 72 u gerando o fragmento com *m/z* 501 u (massa real de 478 u), que sugere a perda de um grupamento cetoácido, e a perda de 170 u que sugere a perda de todo grupo pirrólico substituído gerando o fragmento com *m/z* 403 u (massa real de 380 u. Estes anéis pirrólicos substituídos, principalmente com grupamentos carboxílicos, também foram demonstrados em estudos anteriores, por degradação da melanina de *Sepia* e de melaninas polimerizadas a partir de DHICA (NAPOLITANO; PEZZELLA; PROTA, 1996; WAKAMATSU; ITO, 2002).

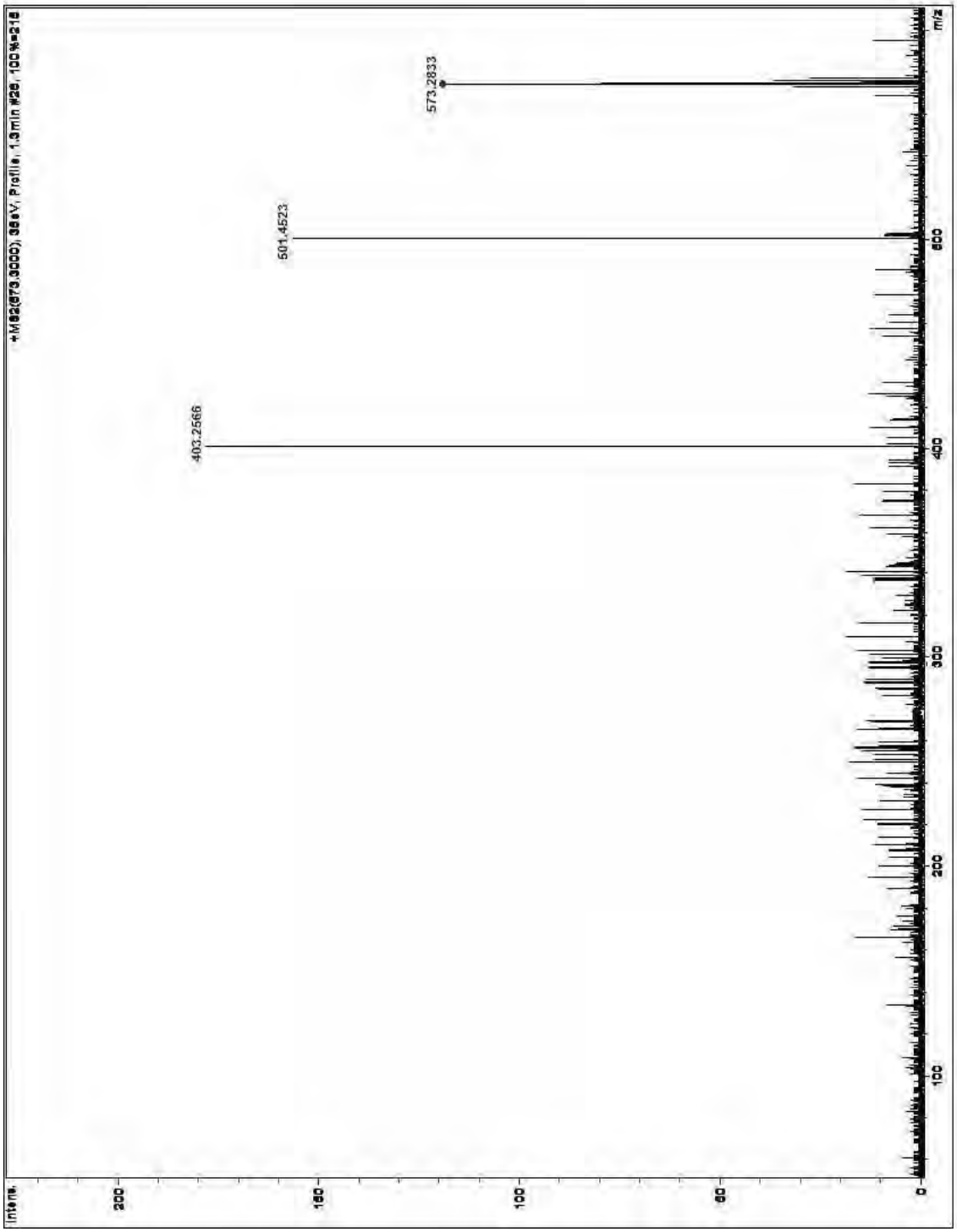


Figura 11 – Fragmentograma de *ESI*-MS/MS (modo positvo, 35 eV) monitorando os fragmentos “filhos” de *m/z* 573 u.

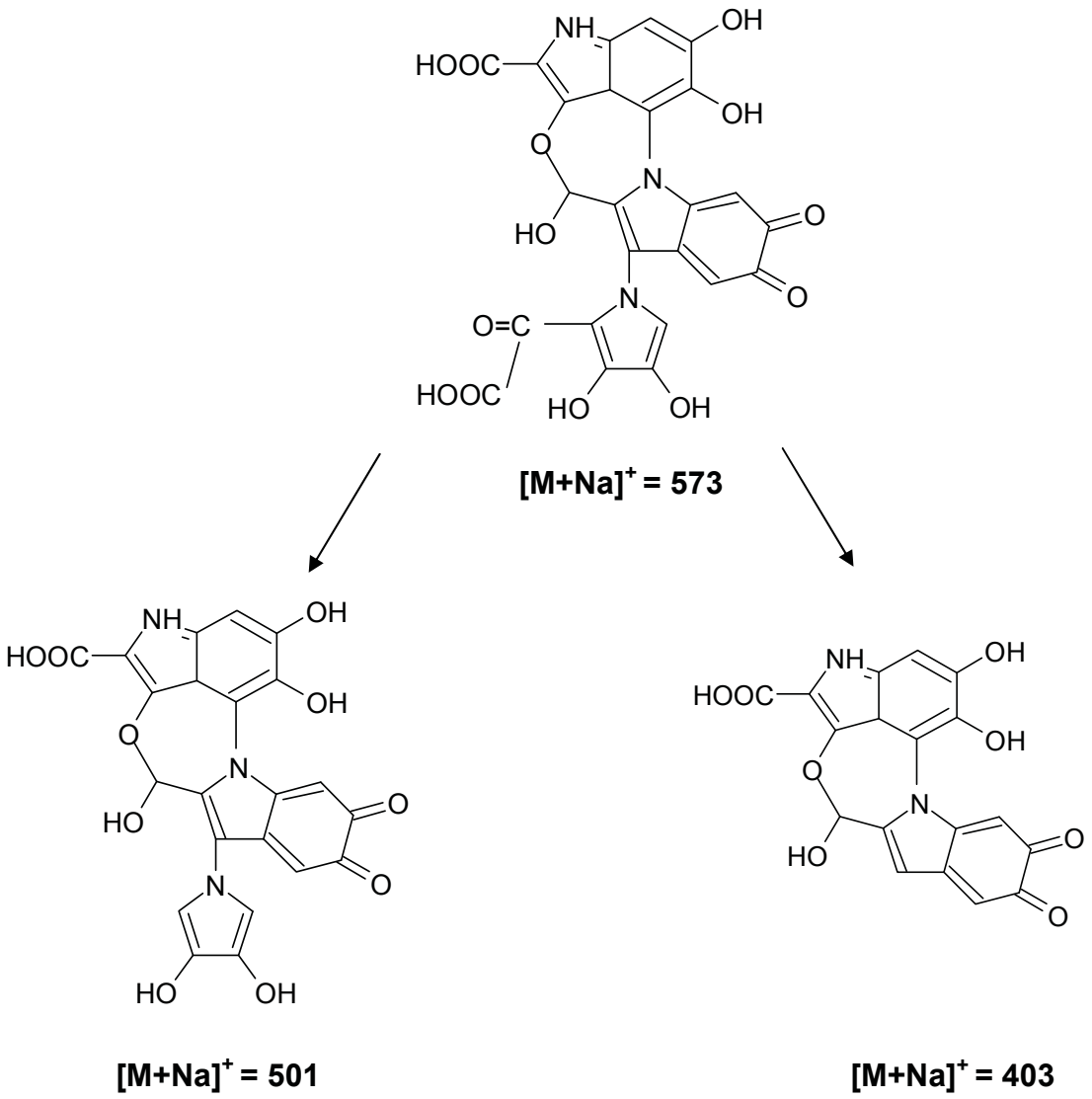


Figura 12 – Estruturas propostas para o fragmento com *m/z* 573 u e de seus fragmentos “filhos”.

O espectro de *ESI*-MS/MS do pico *m/z* 550 u está apresentado na figura 13. Os resultados demonstram que o fragmento representado por *m/z* 550 u fornece um fragmento “filho” de *m/z* 297 u, no entanto estes referem-se à moléculas cationizadas $[M+Na]^+$, que apresentam, portanto, massa real de 527 e 274 u, respectivamente.

As estruturas propostas para o fragmento com *m/z* 550 u e seu fragmento com *m/z* 297 u estão apresentadas na figura 14. A estrutura do fragmento com *m/z* 550 u (representando uma espécie com massa real de 527 u) é composta de uma unidade

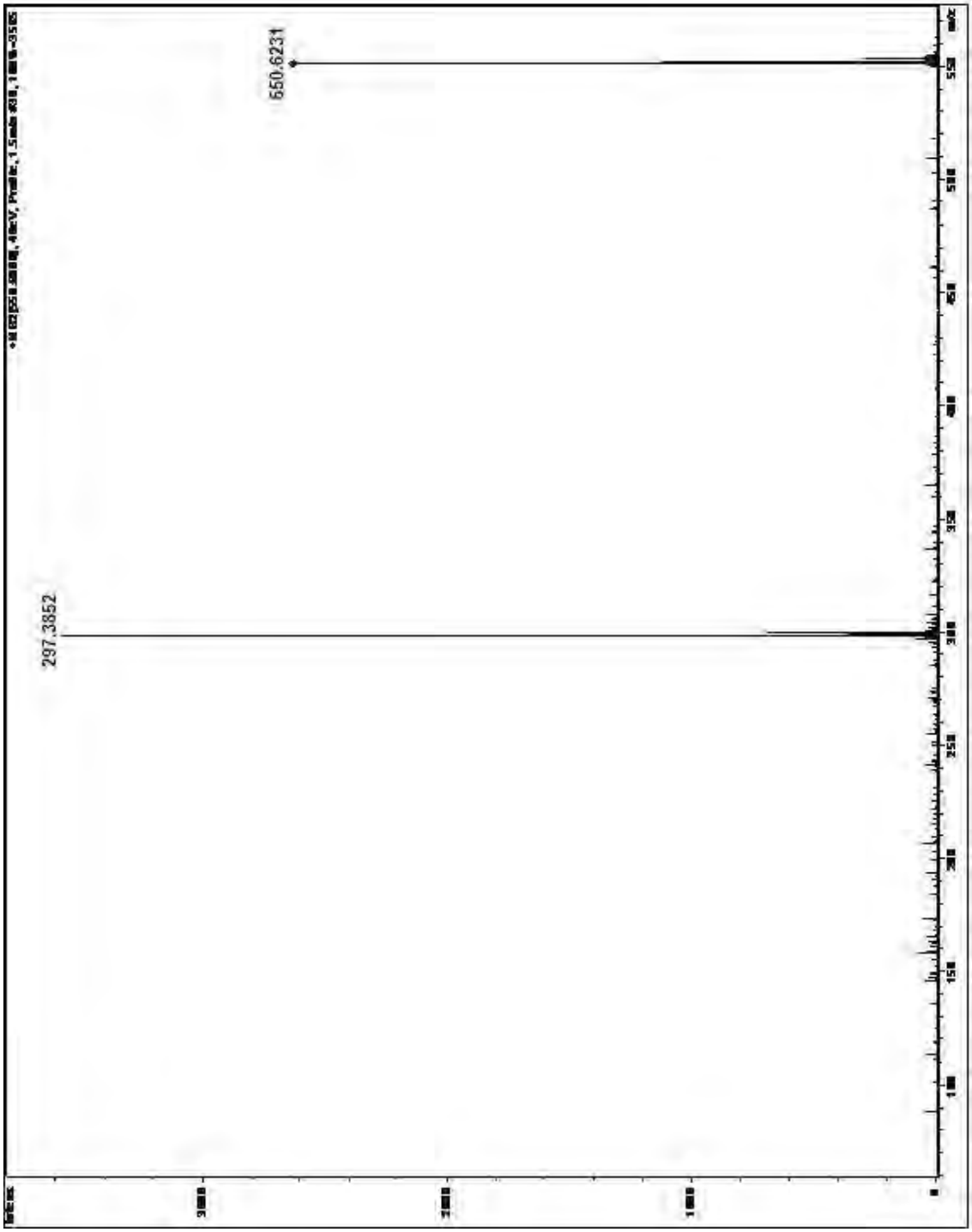


Figura 13 – Fragmentograma de *ESI*-MS/MS (modo postivo, 40 eV), monitorando os fragmentos “filhos” de *m/z* 550 u.

5,6-diidroxindol com um grupo cetoácido na posição 2 e dois grupamentos pirrólicos apresentando grupamentos hidroxila, ácido carboxílico e aldeídico, que foram confirmados com o fragmento de *m/z* 297 u (representando uma espécie com massa real de 274 u), no qual ocorreu a perda de uma unidade pirrólica, juntamente com o grupamento cetoácido do diidroxindol, totalizando uma perda de massa de 253 u.

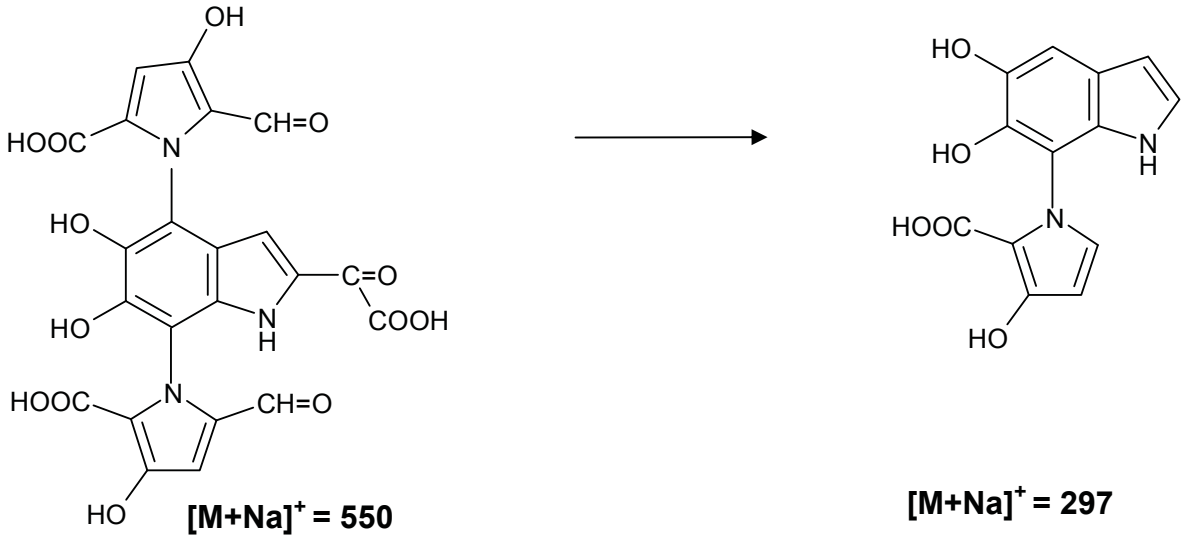


Figura 14 - Estruturas propostas para o fragmento com *m/z* 550 u e seu fragmento "filho".

Estes resultados foram confirmados com o experimento de *ESI*-MS/MS do íon cationizado de *m/z* 522 u, que forneceu um fragmento "filho" de *m/z* 297 u (Figura 15). O íon cationizado que apresenta m/z 522 u (representando uma massa de 499 u) é composto das mesmas unidades do fragmento com m/z 550 u, no entanto com a ausência do grupamento aldeídico. O fragmento com m/z 297 u (representando uma massa real de 274 u), que também foi obtido na fragmentação do fragmento com *m/z* 550 u, representa o grupo 5,6 diidroxindol sem o grupamento cetoácido e o grupo aldeído (Figura 16).

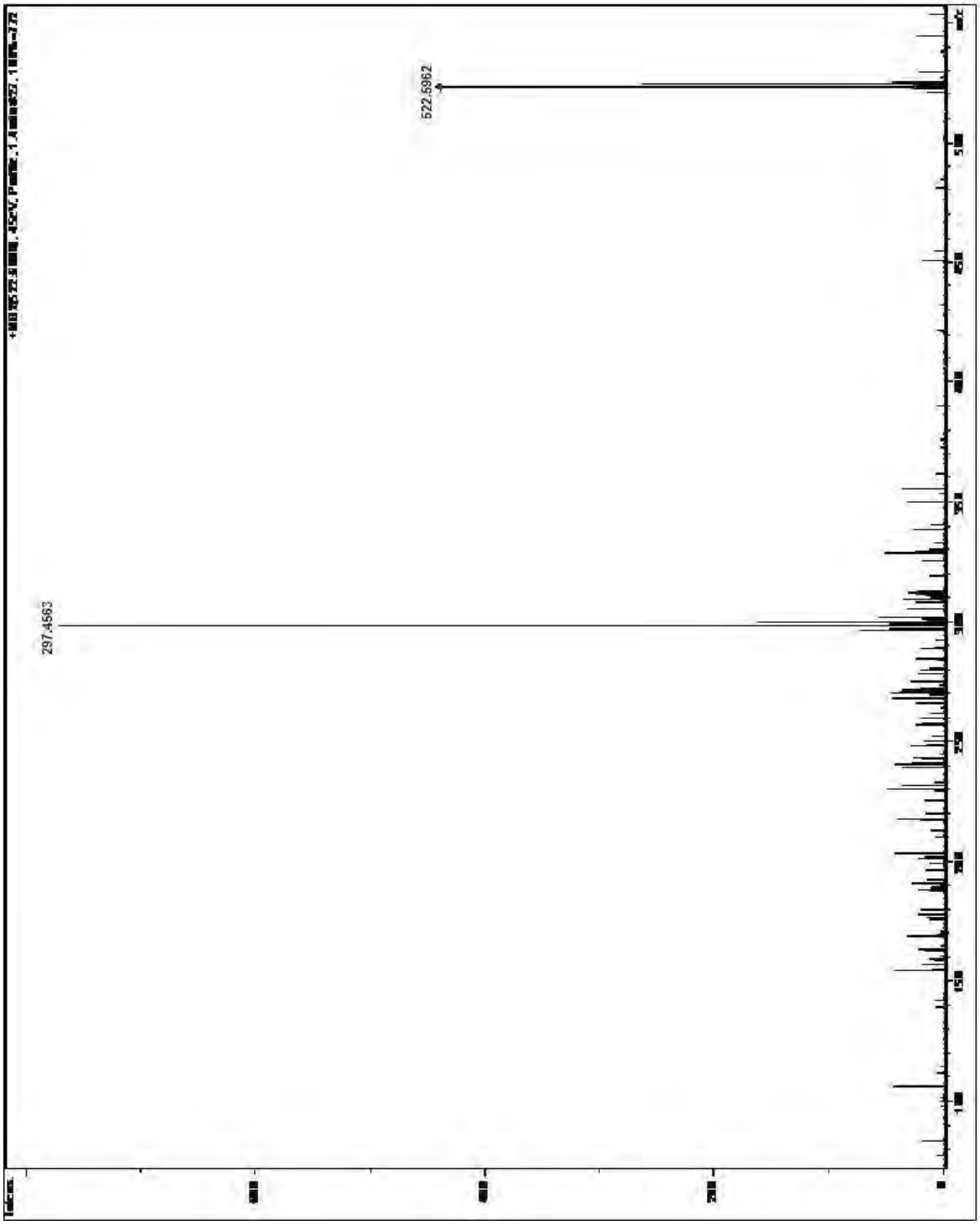
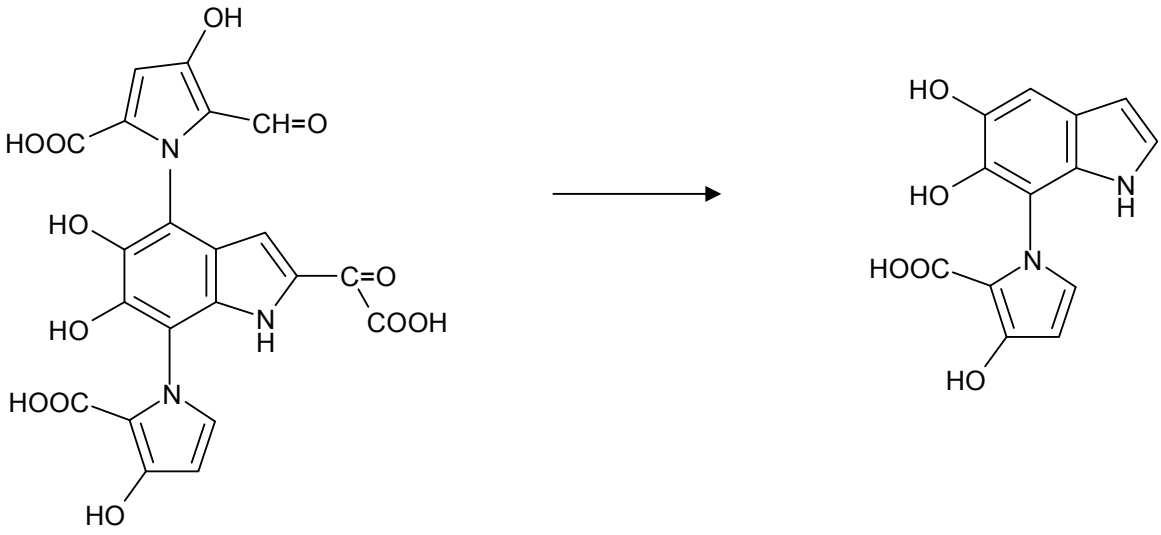


Figura 15 - Fragmentograma de *ESI*-MS/MS (modo postivo, 45 eV), monitorando os fragmentos “filhos” de *m/z* 522 u.



[M+Na]$^+$ = 522 **[M+Na]$^+$ = 297**

Figura 16 - Estruturas propostas para o fragmento com *m/z* 522 u e seu fragmento "filho".

O fragmentograma obtido no experimento de *ESI*-MS/MS do fragmento em *m/z* 397 u, com seu respectivo fragmento filho, está apresentado na figura 17. Os resultados estruturais também sugerem que tenham sido formados íons cationizados $[M+Na]^+$. A estrutura proposta para o íon cationizado observado em *m/z* 397 u (representando uma molécula com massa real de 374 u), está apresentada na figura 18, e é formada por uma unidade 5,6-diidroxindol com um grupamento cetoácido e uma unidade pirrólica semelhante àquelas encontradas anteriormente, com um grupamento hidroxil, uma unidade carboxílica e um grupo aldeído. O fragmento filho encontrado em m/z 325 u representando uma espécie com massa 302 u) constitui uma perda de massa de 72 u, o qual mostra que o grupo cetoácido foi retirado do fragmento com *m/z* 397.

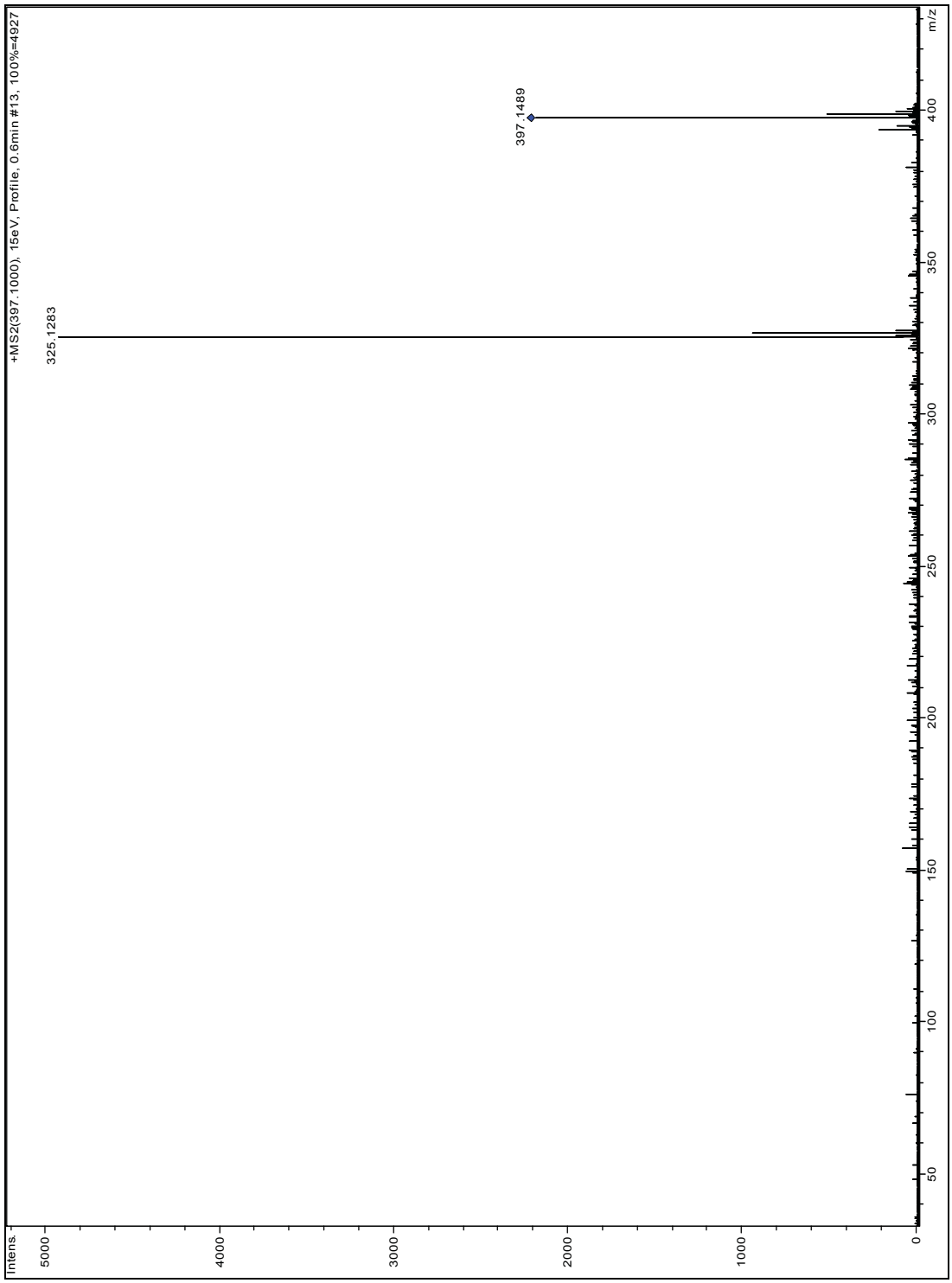
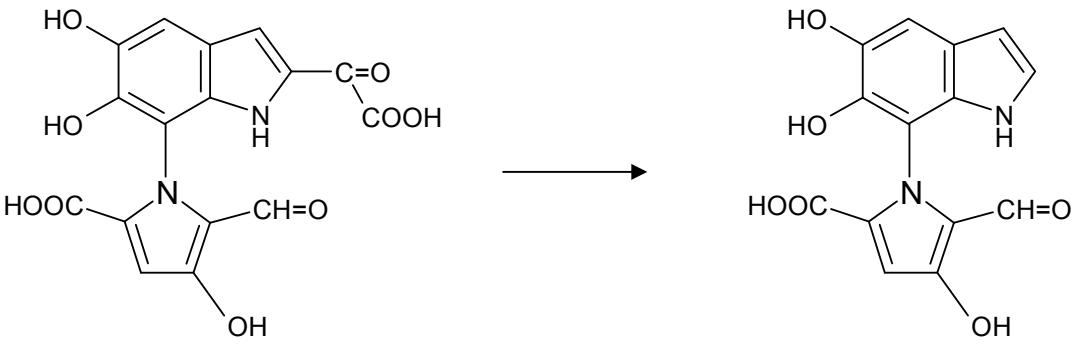


Figura 17 – Fragmentograma de *ESI*-MS/MS (modo postivo, 15 eV), monitorando os fragmentos “filhos” de *m/z* 397 u.



[M+Na]$^+$ = 397 **[M+Na]$^+$ = 325**

Figura 18 - Estruturas propostas para a espécie com *m/z* 397 u. e seu fragmento "filho".

O outro fragmento analisado por *ESI*-MS/MS foi o de *m/z* 325 u, que está apresentado na figura 19. A estrutura proposta para esta espécie (massa real de 302 u) está apresentada na figura 20. A unidade é composta de um grupamento 5,6-diidroxindol, e um anel pirrólico substituído com grupamentos carboxílicos, hidroxil e aldeídico. A partir desta estrutura foram gerados dois fragmentos "filhos", com *m/z* 309 e 253 u e, considerando que estes fragmentos também estão cationizados com sódio, teremos uma massa real de 286 u e 230 u, respectivamente. O fragmento com *m/z* 309 u sugere a perda de um grupamento hidroxil da unidade pirrólica, e o fragmento filho com *m/z* 253 u sugere a perda do grupamento carboxil e aldeídico também do grupo pirrol.

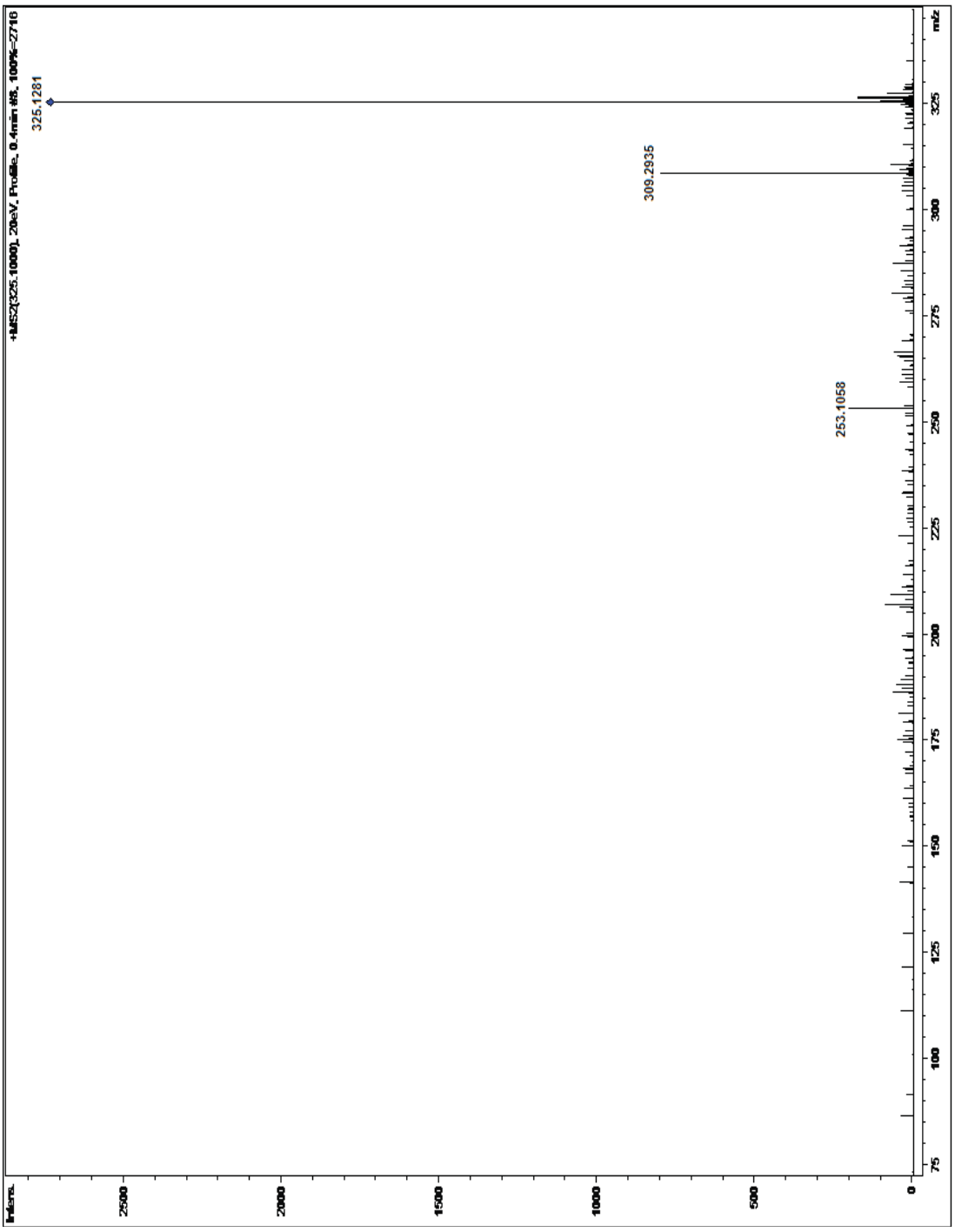


Figura 19 - Fragmentograma de ESI-MS/MS (modo postivo, 20 V), monitorando os fragmentos “filhos” de *m/z* 325 u.

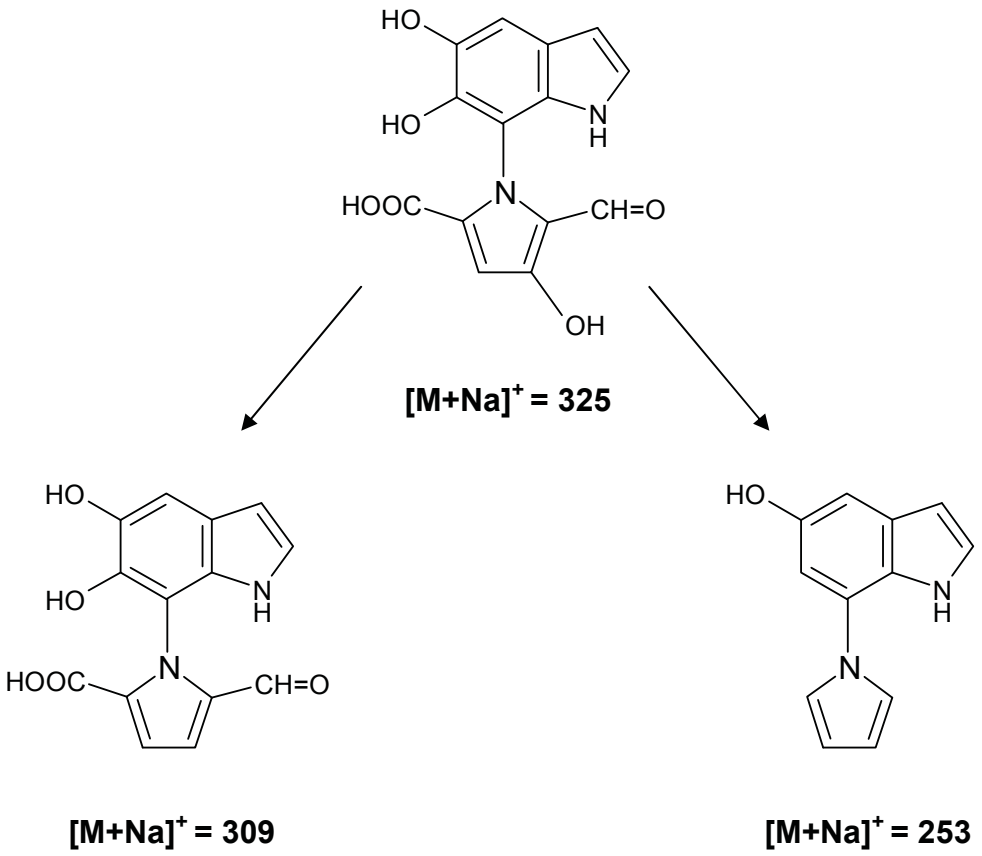


Figura 20 - Estruturas propostas para a espécie com *m/z* 325 u e seus fragmentos "filhos".

Os resultados encontrados sugerem que a estrutura da melanina do mutante MEL1 apresenta duas grandes unidades, representadas pelos fragmentos de massas moleculares igual a 573 e 550 u, com grupamentos diidroxindol e anéis pirrólicos substituídos. A estrutura proposta para estes fragmentos está de acordo com os relatos da literatura sobre a estrutura da DOPA-melanina, a qual a melanina seria um heteropolímero composto de várias formas carboxiladas e/ou não carboxiladas de anéis diidroxiindol e indolquinona (Figura 4) (BLOIS, 1978; NAPOLITANO; PEZZELLA; PROTA, 1996; WAKAMATSU; ITO, 2002; TRAN; POWELL; MEREDITH, 2006; PLONKA; GRABACKA, 2006).

4.1.4 Análise da melanina por ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

No sentido de mostrar que a capacidade antioxidante da melanina está relacionada a presença de radicais livres na sua estrutura, foi realizada a análise por ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Esta técnica permite detectar a presença de elétrons desemparelhados baseada no momento magnético de *spin* dos elétrons livres (AUGUSTO, 2006). O paramagnetismo estável dos biopolímeros de melanina, associado com os radicais livres do tipo semiquinonas ou semiquinoninas presentes (Figura 40), permite o uso do EPR para uma possível investigação estrutural (BUZMAN et al., 2003; KAYSER, PALIVAN, 2006).

Pelos resultados do espectro de EPR*,* apresentados nas figuras 21 e 22, podemos observar que a melanina do mutante MEL1 e a sintética apresentam praticamente o mesmo sinal de EPR. A partir destes gráficos foi calculado o fator *g*, que fornece a posição absoluta do campo magnético em um espectro de EPR, cujos valores foram muito próximos para ambas as melaninas, em torno de 2,007. O perfil observado indica a presença de elétrons livres desemparelhados na estrutura da melanina do mutante, devido a presença de semiquinonas (Figura 17), o que explicaria a sua capacidade de capturarem radicais livres agindo tanto como pro-oxidante como antioxidante.

Portanto, as melaninas de várias origens apresentam como característica comum a presença de um centro paramagnético de alta estabilidade, o qual revela a sua capacidade de interagir com radicais livres. COMMONER et al. (1954) reportou que a melanina apresenta um sinal de absorção pela espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), o qual é indicativo da presença de radicais livres no polímero de melanina, como radicais semiquinonas do grupo 5,6-dihidroxiindol formados durante a polimerização oxidativa (Figura 3). Blois (1978) confirmou esta hipótese usando inibidores da polimerização do radical livre, como o ácido ascórbico, que bloqueia a formação de melanina *in vitro.*

Estes resultados foram similares aos sinais de EPR gerados por melaninas extraídas de *Cryptococcus neoformans* (ROSAS et al., 2000), *Paracoccidioides brasiliensis* (GOMEZ et al., 2001), *Sporothrix schenckii* (MORRIS-JONES et al., 2003) e *Aspergillus fumigatus (*YOUNGCHIM et al., 2004).

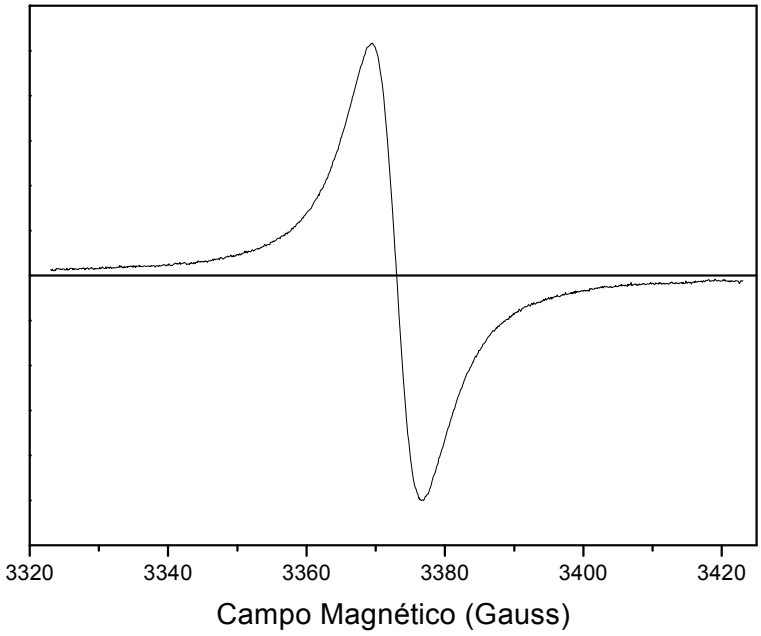


Figura 21 – Espectro de EPR da melanina sintética operando em 9,4 GHz.

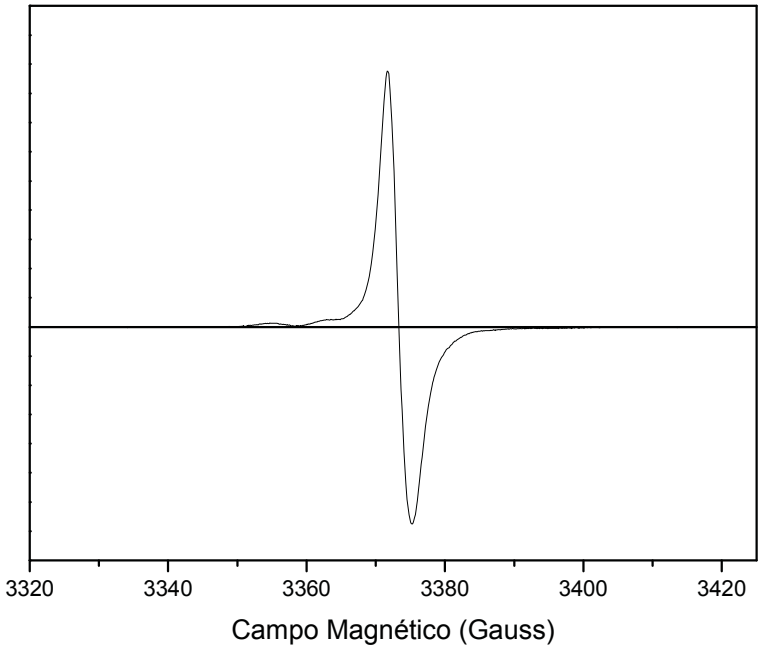


Figura 22 – Espectro de EPR da melanina extraída do mutante MEL1 operando em 9,4 GHz.

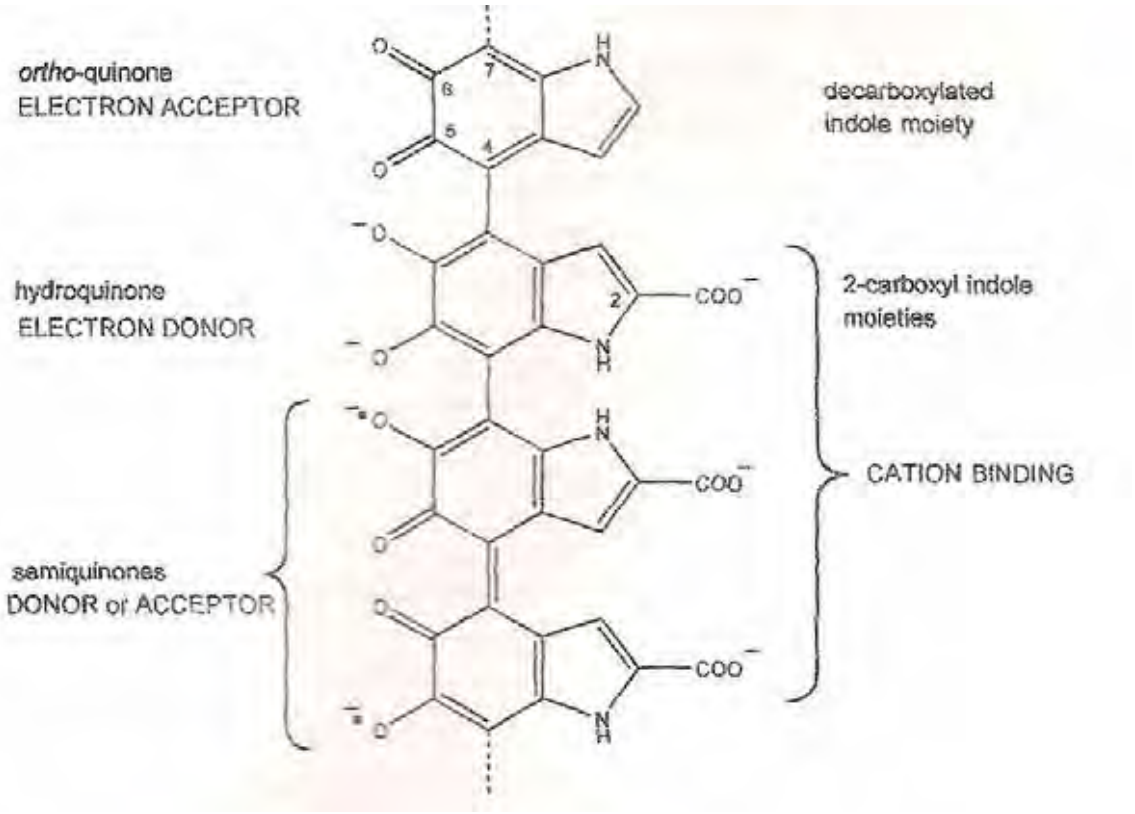


Figura 23 – Estrutura parcial de melaninas mostrando grupos semiquinonas responsáveis pelos sinais na análise por EPR [retirado de RILEY (1997)].

4.2 Avaliação das atividades biológicas

A avaliação das atividades biológicas da melanina extraída do mutante MEL1 foi feita através de testes *in vitro,* pois embora estes bioensaios fármaco-toxicológicos não substituam os testes em animais(*in vivo)*, eles são usados em estudos preliminares para uma rápida triagem de novos xenobióticos.

4.2.1 Determinação da citotoxicidade basal *in vitro* da melanina

De acordo com o ISO 10993 (International Standard Organization), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* deve ser o primeiro teste realizado em substâncias com potencial farmacológico, pois define as concentrações que podem ser usadas para evitar danos celulares e também avaliam a compatibilidade da substância em uma formulação farmacêutica final. Somente depois de comprovada a sua não toxicidade é que a substância pode ser ensaiada em animais de laboratório e em humanos (CHÁVES et al., 2006; ROGERO et al., 2003).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* têm sido atualmente aplicados no desenvolvimento piloto de novas drogas em função da sua maior rapidez, economia e também por mostrarem uma boa correlação com o teste de $DL_{50,}$ (dose letal para 50% dos animais testados), permitindo a extrapolação direta de dados quantitativos à situações análogas *in vivo* (BACON; LINSEMAN; RACZNIAK, 1990; SHRIVASTAVA et al.,1992). Nestes testes a citotoxicidade é avaliada através da determinação do índice citotóxico (IC_{50}), que é a concentração do agente que reduz 50% da absorbância espectrofotométrica, obtido por análise de regressão linear a partir das curvas de dose-resposta. Apesar de existirem outras técnicas na determinação de citotoxicidade *in vitro*, neste trabalho foi usada a técnica do corante vermelho neutro por possuir um “endpoint” mais sensível (GARZA-OCANAS et al*.,* 1992; MOREIRA NETO, 1999).

Os resultados obtidos para a melanina sintética e para a melanina extraída do mutante MEL1 mostraram índices médios de citoxicidade de cerca de 406 µg/mL para a melanina sintética e em torno de 373 µg/mL para a melanina extraída do mutante MEL1 (Tabela 2 e Apêndice 2.1). Estes valores indicam que ambas as melaninas possuem baixa citotoxicidade em comparação com agentes citostáticos como a cisplatina e a epirubicina, que apresentam IC_{50} de 41,2 µg/mL e 15,9 µg/mL, respectivamente (DEVIENNE, 2000). Alguns estudos com substâncias que apresentam grupos químicos semelhantes aos das melaninas relataram alta

citotoxicidade. CHÁVEZ et al. (2006), realizaram estudos citotóxicos com substâncias extraídas de plantas e demonstraram que as de composição fenólica danificaram mais as células, consequentemente apresentaram menores IC_{50}, sendo este efeito atribuído à presença de grupos hidroxila que podem aumentar as espécies reativas de oxigênio possibilitando lesão celular através do processo de peroxidação lipídica.

Tabela 2 – Índice citotóxico (IC_{50}) da melanina sintética e da melanina extraída do mutante MEL1 de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.

	IC_{50} (µg/mL)	
	Melanina do mutante MEL1	**Melanina sintética**
Experimento 1	372,9 ± 2,5	402 ± 2,3
Experimento 2	377,2 ± 2,8	417 ± 2,3
Experimento 3	375,4 ± 2,4	395 ± 3,1
Experimento 4	368,5 ± 1,9	412 ± 3,2

Também foi realizado o ensaio de citotoxicidade das melaninas após metabolização, utilizando a fração microssomal hepática S9, pois algumas substâncias somente apresentam efeito citotóxico após a biotransformação. Um exemplo é a ciclofosfamida, um agente antineoplásico que requer ativação metabólica por enzimas hepáticas do sistema citocromo P-450, para que os metabólitos possam exercer atividade antitumoral (RANG; DALE; RITTER, 2003).

A presença de grupos nitrogenados das unidades indólicas presentes na estrutura da melanina (Figuras 12 e 14), proporcionam pontos para que ocorram reações de oxidação, sugerindo, portanto, que na presença da fração microssomal S9 pode ocorrer a ativação metabólica do pigmento.

A fração microssomal hepática S9, faz parte de um grupo de enzimas do citocromo P-450, e estão ligadas à membrana do retículo endoplasmático, que é composta basicamente por proteínas e lipídeos. Quando o fígado é removido e homogeneizado, o retículo endoplasmático é rompido e as isoenzimas presentes podem ser isoladas por centrifugação. O sobrenadante obtido é chamado de fração

S9 e é rica em enzimas solúveis que podem ser avaliadas quanto à sua capacidade catalítica frente a substratos específicos (PARKINSON, 1998).

O citocromo P450 é responsável por reações de oxidação, as quais fazem parte do grupo de reações de biotransformação de fase I, que causam aumento da polaridade da substância a ser metabolizada e ancoram grupos para subseqüentes reações de conjugação (WERMUTH, 2003; THOMAS, 2003). As principais reações catalisadas por este sistema estão apresentadas na figura 24.

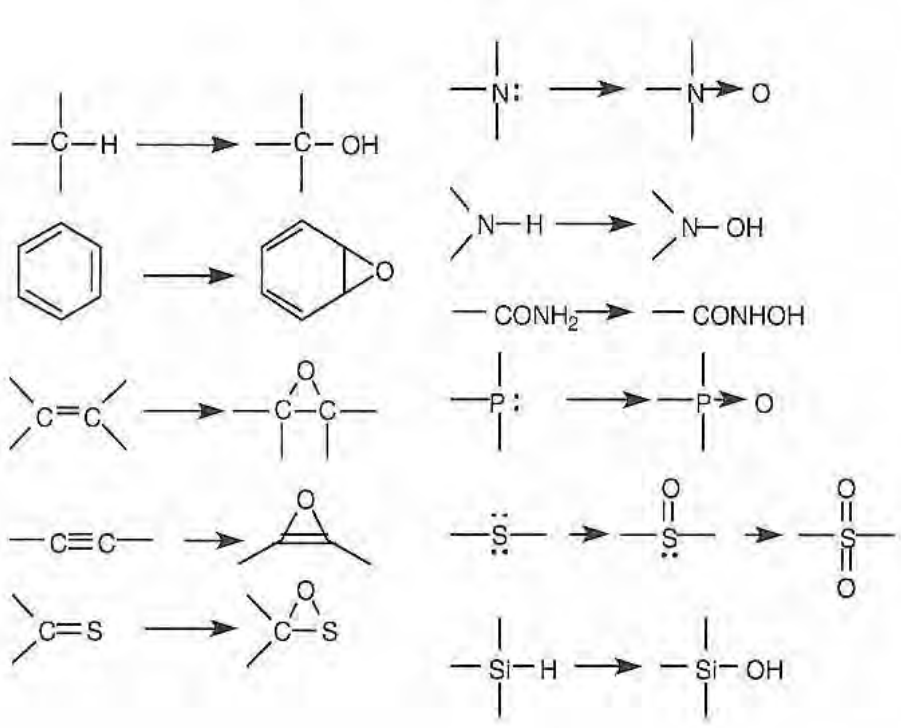


Figura 24 – Principais reações de biotransformação catalisadas pelo citocromo P450 (retirado de WERMUTH, 2003).

O valor de IC_{50} para o pigmento extraído do mutante MEL1 obtido depois de submetido à fração S9, foi em torno de 413 µg/mL, enquanto que para a melanina sintética o resultado foi em torno de 316 µg/mL, na mesma condição (Tabela 3 e apêndice 2.1). Os resultados obtidos com a ciclofosfamida (Figura 25), revelam que após a ativação pela fração S9 não se observa células viáveis na concentração de 22 µg/mL, com um IC_{50} de aproximadamente 15 µg/mL, o que não acontece antes deste processo. Comparando os resultados sem e com ativação pela fração S9 para ambas as melaninas (Figura 26), verifica-se que os perfis das curvas dose-resposta

e os valores de IC_{50} foram muito semelhantes, indicando que as melaninas apresentam um baixo efeito citotóxico.

Tabela 3 – Índice citotóxico (IC_{50}) após metabolização pela fração S9 da melanina sintética e da melanina extraída do mutante MEL1 de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.

	IC_{50} (µg/mL)	
	Melanina do mutante MEL1	**Melanina sintética**
Experimento 1	408,1 ± 2,3	314 ± 3,2
Experimento 2	415,2 ± 3,8	316,2 ± 2,1
Experimento 3	412,2 ± 3,3	316,4 ± 2,3
Experimento 4	417 ± 3,1	318 ± 3,4

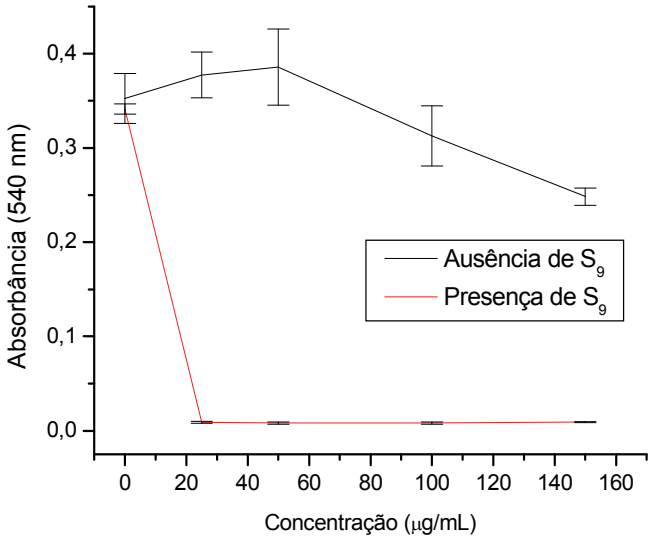


Figura 25 - Curva dose-resposta de diferentes concentrações de ciclofosfamida na ausência e presença de sistema de ativação metabólica (S9). Resultados apresentados como média ± desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes.

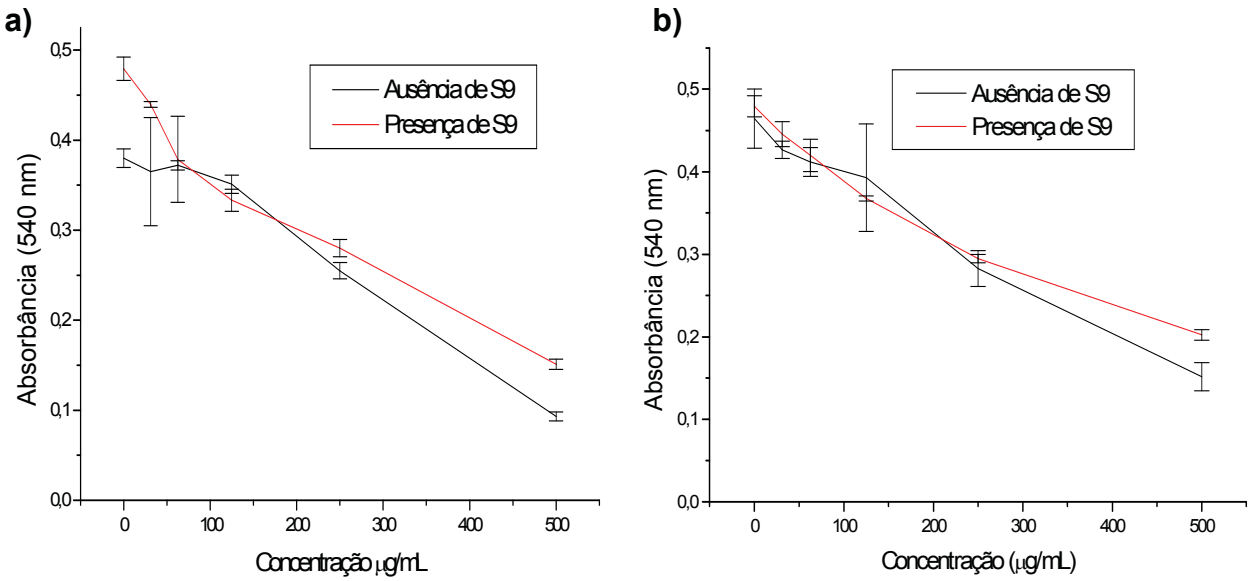


Figura 26 - Curva dose-resposta de diferentes concentrações da melanina extraída do mutante MEL1 (a) e da melanina sintética (b) na ausência e na presença de sistema de ativação metabólica (S9). Resultados apresentados como média ± desvio padrão de, no mínimo, 4 experimentos independentes feitos em triplicata.

URABE et al. (1994) mostraram que apenas os precursores da síntese do DOPA-melanina, diidroxifenilalanina (DOPA) e 5,6-diidroxindol, são citotóxicos em células de melanoma. Alguns pigmentos semelhantes à melanina, como o prodigiosin, um pigmento vermelho extraído de *Serratia marcescens,* apresenta citotoxicidade somente em células tumorais (SOTO-CERRATO et al., 2004). Em relação aos nossos resultados, a melanina do fungo apresentou altos valores de IC_{50}, tanto antes como após a metabolização, indicando que este pigmento não causa danos significativos no sistema celular testado.

Na Figura 27 estão mostrados os resultados da microscopia de lâminas das células McCoy na presença de melanina extraída do mutante MEL1. Embora a melanina apresente baixos índices de citotoxicidade, estas micrografias mostram que a melanina interage com a membrana celular.

A) B)

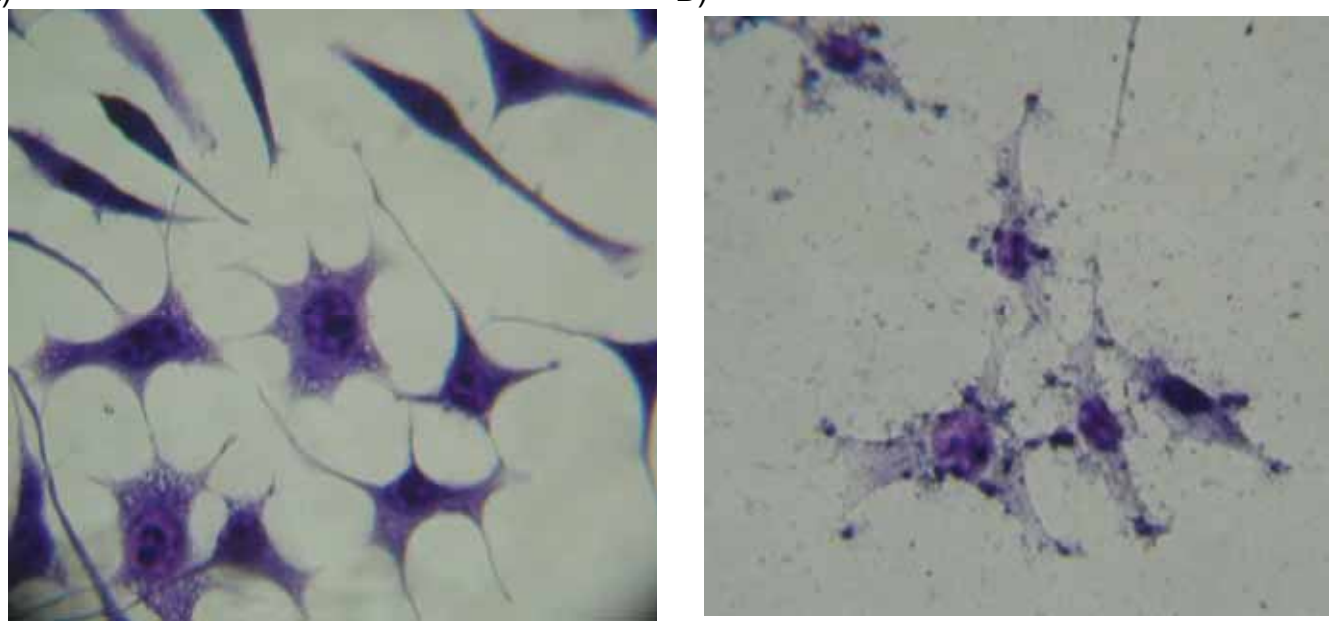


Figura 27 – Microscopia óptica das células McCoy na ausência (A) e na presença da melanina extraída do mutante MEL1 (B).

4.2.2 Atividade mutagênica *in vitro* da melanina

O objetivo deste teste foi avaliar o potencial mutagênico da melanina extraída do mutante MEL1 pelo estudo de reversão da utilização do aminoácido histidina em cepas de *Salmonella typhimurium*. A importância da integração dos ensaios de genototoxicidade aos testes que avaliam propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas de novos fármacos, é enfatizada por KRISHNA et al. (1998), uma vez que esses testes vêm sendo requeridos, em todo mundo, para aprovação de novos produtos.

Para a linhagem TA97a o número de revertentes obtido na presença de várias concentrações de melanina do fungo, sem ativação metabólica, não foram significativamente diferentes do controle negativo e os valores de RM não foram maiores que 2,0 (Tabela 4). Os resultados para esta linhagem após a ativação metabólica, mostraram número de revertentes significativamente diferentes do controle negativo em todas as concentrações, exceto a de 1 mg/mL (Tabela 4). No entanto, os valores de RM foram menores que 2,0 e também não houve relação linear entre a concentração de melanina e o número de revertentes, pois na concentração de 1 mg/mL o número de revertentes e o RM foram menores que os anteriores. Para as linhagens TA98, TA100 e TA 102 (Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente), os números de revertentes não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo, e as razões de mutagenicidade foram menores que 2,0, tanto na presença como na ausência do sistema de ativação metabólica.

Estudos semelhantes com a melanina presente no cabelo humano, utilizando as linhagens TA1535, TA1538, TA100 e TA98, demonstraram que o pigmento se tornava

Tabela 4 – Número de revertentes e valores de RM da melanina extraída do mutante MEL1 com e sem ativação metabólica sobre a linhagem TA97a de *S. typhimurium.* Valores apresentados como média ± desvio padrão.

Melanina	**Número de revertentes**		**RM**	
(mg/placa)	**- S_9**	**+S_9**	**- S_9**	**+S_9**
0[a]	136 ± 18	151 ± 3		
0[b]	1983 ± 72	1206 ± 14		
0,125	200 ± 5	256 ± 1**	1,47	1,69
0,25	181 ± 4	254 ± 1**	1,37	1,68
0,50	142 ± 3	252 ± 4**	1,04	1,66
1	136 ± 1	210 ± 3	1	1,39

*p<0,05 (ANOVA) resultados estatisticamente diferentes comparando o controle negativo e a amostra.

**p<0,01 (ANOVA) resultados estatisticamente diferentes comparando o controle negativo e a amostra.

[a] Controle negativo (0): dimetilsulfóxido 75 µL/placa.

[b] Controle positivo (+): TA 97a (- S_9) 4-nitrofenilenodiamina 10 µg/placa; TA 97a (+ S_9) 2-antramino 3 µg/placa.

Tabela 5 – Número de revertentes e valores de RM da melanina extraída do mutante MEL1 com e sem ativação metabólica sobre a linhagem TA98 de *S. typhimurium.* Valores apresentados como média ± desvio padrão.

Melanina	**Número de revertentes**		**RM**	
(mg/placa)	**- S_9**	**+S_9**	**- S_9**	**+S_9**
0[a]	24 ± 1	35 ± 2		
0[b]	2782 ± 20	1014 ± 31		
0,125	26 ± 1	36 ± 1	1,006	1,01
0,25	22 ± 1	35 ± 0	0,92	0,96
0,50	21 ± 1	35 ± 1	0,88	0,96
1	20 ± 1	34 ± 2	0,84	0,97

*p<0,05 (ANOVA) resultados estatisticamente diferentes comparando o controle negativo e a amostra.

**p<0,01 (ANOVA) resultados estatisticamente diferentes comparando o controle negativo e a amostra.

[a] Controle negativo (0): dimetilsulfóxido 75 µL/placa.

[b] Controle positivo (+): TA 98 (- S_9) 4-nitrofenilenodiamina 10 µg/placa; TA 98 (+ S_9) 2-antramino 3 µg/placa.

Tabela 6 – Número de revertentes e valores de RM da melanina extraída do mutante MEL1 com e sem ativação metabólica sobre a linhagem TA100 de *S. typhimurium.* Valores apresentados como média ± desvio padrão.

Melanina	**Número de revertentes**		**RM**	
(mg/placa)	**- S_9**	**+S_9**	**- S_9**	**+S_9**
0[a]	126 ± 8	164 ± 6		
0[b]	1697 ± 11	1180 ± 48		
0,125	156 ± 2	195 ± 1	1,24	1,19
0,25	150 ± 1	176 ± 3	1,19	1,07
0,50	126 ± 1	166 ± 1	1	1,01
1	107 ± 1	162 ± 1	0,85	0,98

*p<0,05 (ANOVA) resultados estatisticamente diferentes comparando o controle negativo e a amostra.

**p<0,01 (ANOVA) resultados estatisticamente diferentes comparando o controle negativo e a amostra.

[a] Controle negativo (0): dimetilsulfóxido 75 µL/placa.

[b] Controle positivo (+): TA 100 (- S_9) azida sódica 2,5 µg/placa; TA100 (+S_9) 2-antramino 3 µg/placa.

Tabela 7 – Número de revertentes e valores de RM da melanina extraída do mutante MEL1 com e sem ativação metabólica sobre a linhagem TA102 de *S. typhimurium.* Valores apresentados como média ± desvio padrão.

Melanina	**Número de revertentes**		**RM**	
(mg/placa)	**- S_9**	**+S_9**	**- S_9**	**+S_9**
0[a]	191 ± 1	304 ± 8		
0[b]	2328 ± 73	336 ± 10		
0,125	279 ± 6	401 ± 23	1,46	1,32
0,25	234 ± 6*	387 ± 5	1,23	1,27
0,50	181 ± 1	353 ± 3	0,95	1,16
1	179 ± 1	339 ± 3	0,94	1,14

*p<0,05 (ANOVA) resultados estatisticamente diferentes comparando o controle negativo e a amostra.

**p<0,01 (ANOVA) resultados estatisticamente diferentes comparando o controle negativo e a amostra.

[a] Controle negativo (0): dimetilsulfóxido 75 µL/placa.

[b] Controle positivo (+): TA 102 (- S_9) mitomicina 3 µg/placa; TA 102 (+ S_9) 2-aminofluoreno 10 µg/placa.

mutagênico somente após tratamento com luz ultravioleta e na ausência de ativação metabólica, em concentrações que variavam de 6,8 a 27,5 mg/placa. Estas observações podem explicar o aumento na incidência de câncer de pele em humanos, particularmente aqueles de cabelos louros e avermelhados, com a exposição à luz solar

(HARSANYI et al., 1980). MIRANDA et al., 1997 demonstrou que o intermediário da síntese de melanina 5,6-diidroxindol, após irradiação com luz ultravioleta (UV), pode levar à formação de ligações cruzadas com a molécula de DNA.

A mutagenicidade de alguns compostos indólicos e substâncias relacionadas como as melaninas, foram estudadas por CURVALL, FLORIN, JANSSON (1982) frente à linhagem TA98 de *Salmonella Typhimurium*, e foi demonstrado que somente compostos possuindo substituintes metil nas posições 2 e 3 do anel indólico apresentam propriedades mutagênicas em doses iguais ou maiores a 3 µmol/placa.

Portanto, com os resultados de mutagenicidade obtidos podemos concluir que a melanina não apresenta propriedades mutagênicas para as linhagens *S. thyphimurium* ensaiadas, principalmente se for usada em formulações cosméticas para aplicação tópica.

4.2.3 Determinação da atividade antimicrobiana da melanina

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando a técnica de microdiluição para os microorganismos Gram-positivos (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus)* e Gram-negativos (*Escherichia. coli)*. Esta técnica é potencialmente útil para determinação da CIM (concentração inibitória mínima = menor concentração que impede o crescimento microbiano), pois pode ser usado frente a uma variedade de microorganismos requerendo pequenas quantidades da substância teste (ELOFF, 1998; DEVIENNE; RADDI, 2002). Neste ensaio, o diluente utilizado foi o dimetilsulfóxido, em concentrações inferiores a 12,5%, pois nestas concentrações não causam diminuição significativa do crescimento bacteriano (DEVIENNE, 2000).

O efeito de diferentes concentrações da melanina do mutante MEL1 e da melanina sintética sobre o crescimento dos microrganismos ensaiados, está mostrado na figura 28 (valores médios de absorbância estão apresentados no apêndice 2.2).

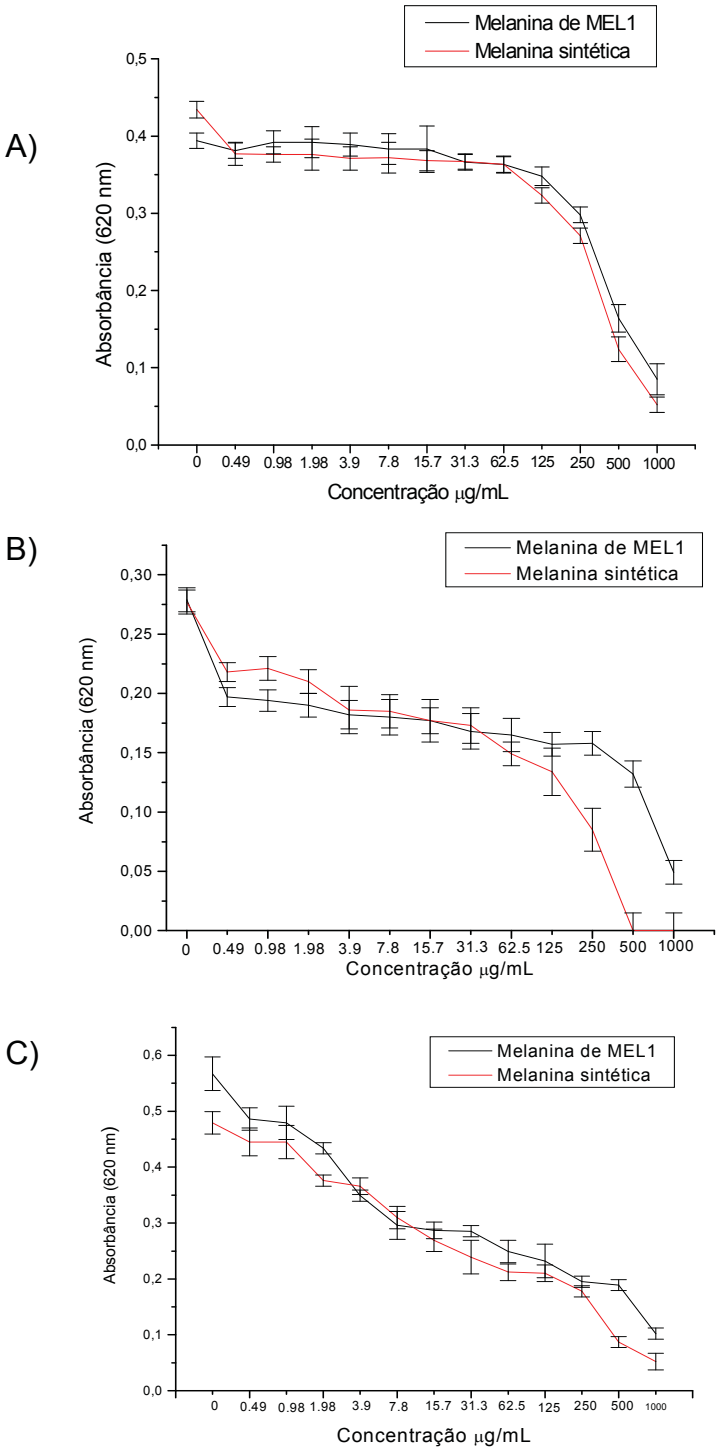


Figura 28 - Relação dose-resposta do crescimento de *Escherichia coli* (A), *Enterococcus faecalis* (B) *e Sthaphylococcus aureus* (C) para melanina sintética e para com a melanina extraída do meio de cultura após cultivo do mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans*.

Pode-se observar que a melanina extraída do mutante MEL1 como também a melanina sintética, até a concentração de 125 μg/mL, não causam uma diminuição acentuada do crescimento de *E. coli* (Figura 28 A) e *E. faecalis* (Figura 28 B), sendo que uma diminuição efetiva da viabilidade microbiana somente foi observada a partir de 500 μg/mL. No entanto, para *S. aureus* observa-se uma diminuição gradativa do crescimento microbiano em função do aumento da concentração das melaninas (Figura 28 C).

Os valores de CIM (calculados a partir das curvas dose-resposta) para a melanina extraída do mutante MEL1 e para a melanina sintética foram iguais ou maiores que 1000 μg/mL para todos os microorganismos ensaiados, exceto para a melanina sintética em relação ao *E. faecalis,* onde o valor de CIM foi de 500 μg/mL. Desta forma, os resultados obtidos sugerem que as melaninas testadas não apresentam atividade antimicrobiana, impedindo o crescimento microbiano somente em concentrações elevadas, com valores de CIM extremamente altos (≥ 1000 μg/mL), quando comparados com as substâncias de referência, ampicilina e cloranfenicol (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em μg/mL da melanina produzida pelo mutante MEL1 e da melanina sintética comparada com as drogas usadas na padronização.

	CIM (μg/mL)		
Substâncias teste	***E. coli***	***S. aureus***	***E .faecalis***
Ampicilina*	8	0,125	
Cloranfenicol*	8	16	
Melanina de MEL1	>1000	>1000	>1000
Melanina sintética	>1000	>1000	500

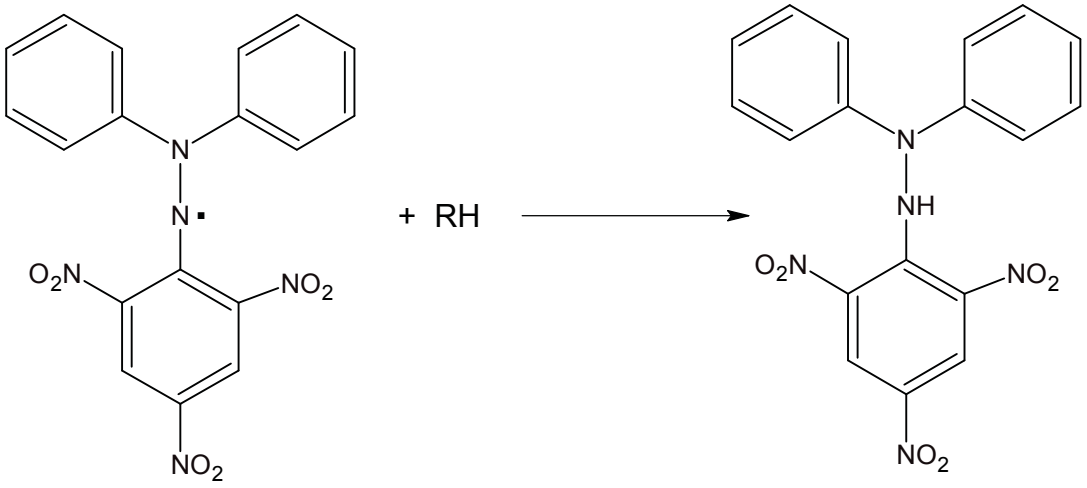
* dados obtidos de Devienne (2000).

4.2.4 Determinação da atividade antioxidante da melanina

A importância biológica das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio está centrada na formação de uma grande variedade de oxidantes secundários, os quais mostram capacidade destrutiva na célula (HALLIWELLL, 1995; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998). Neste trabalho, vários testes *in vitro* foram utilizados para avaliar a capacidade antioxidante da melanina extraída do mutante MEL1 em comparação com a melanina sintética.

4.2.4.1 Teste do DPPH

Um dos testes usados para verificar a propriedade antioxidante de substâncias consiste em avaliar a presença do DPPH (1,1 – difenil – 2 – picril – hidrazil) na sua forma reduzida. Esta redução é devido à capacidade de algumas substâncias de doar hidrogênio radicalar ao DPPH, formando assim, um radical estável (Figura 29).



1,1-difenil-2-picril-hidrazila
Coloração púrpura

Coloração amarela

Figura 29 - Reação de redução do DPPH (1,1 – difenil – 2 – picril – hidrazil) por um agente redutor (RH).

Os resultados para este teste, apresentados na figura 30 e apêndice 2.3, mostram a redução do radical livre DPPH, diretamente proporcional ao aumento da concentração das melaninas do mutante MEL1 e sintética, sendo que os valores de IC_{50} (concentração que inibe em 50% o radical DPPH) foram de 8 μg/ mL e 7 μg/ mL, respectivamente. Estes resultados foram bem próximos àqueles obtidos para o trolox (IC_{50} = 5 μg/ mL), uma substância com atividade antioxidante comprovada, sugerindo que o pigmento melanina apresenta potencial antioxidante frente ao radical livre DPPH.

A redução do radical DPPH ocorreu provavelmente devido a presença de unidades diidroxindol na estrutura da melanina do fungo (Figura 12), que fornece o hidrogênio do radical OH em uma reação com transferência de elétrons.

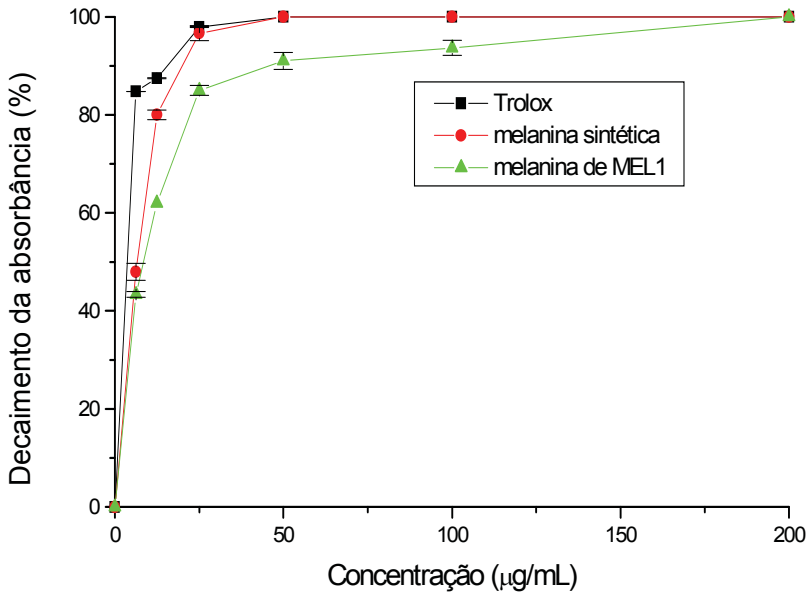


Figura 30 – Efeito da melanina extraída do mutante MEL1, da melanina sintética e do trolox (controle) na redução do radical livre DPPH. Resultados apresentados como média ± desvio padrão de, no mínimo, 3 experimentos independentes.

4.2.4.2 Ensaio da Deoxirribose

O ensaio da deoxirribose, descrito por HALLIWELL et al. (1987), foi realizado para determinar a capacidade da melanina em neutralizar radical hidroxil ($OH^{\bullet}$)

formado, o qual é considerado uma das espécies mais reativa em sistemas biológicos (HALLIWELL, 1991; MAFRA; ABDALA; COZZOLINO, 1999).

A combinação extremamente rápida do radical hidroxil com metais ou outras moléculas orgânicas explicam porque este é considerado uma das espécies mais reativas. No DNA, o radical $OH^{\bullet}$ pode causar modificações nas bases purínicas, pirimidínicas e na pentose 2-desoxirribose levando à mutação. Pode inativar várias proteínas, oxidando seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (–SS), e também pode iniciar a lipoperoxidação ao oxidar os ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (AUGUSTO, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998).

O radical hidroxil pode ser formado a partir de reações catalizadas por íons, como a reação de Haber-Weiss (equação 1) e reação de Fenton (equação 2) (ARUOMA, 1995).

Equação 1

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{Fe/Cu} O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$$

Equação 2

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$$

Os resultados obtidos para a melanina do mutante MEL1, melanina sintética e trolox (substância controle) estão apresentados na figura 31. Neste ensaio, a presença da melanina do fungo e da sintética ocasionou uma inibição da ação do radical hidroxil sobre a pentose, a qual foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do pigmento. Na concentração de 200 µg/mL esta inibição atingiu níveis de 87% e 90%, respectivamente, para a melanina do fungo e sintética, sendo que a análise estatística demonstrou que não há diferenças significativas no percentual de inibição para as duas melaninas (Apêndice 2.3). No caso do trolox (controle) não foi observada uma correlação entre inibição do radical e concentração, pois 95% de inibição foi obtida com apenas 25 µg/mL. Em função dos resultados obtidos, pode-se considerar que o pigmento extraído do mutante MEL1 exerce atividade antioxidante efetiva inibindo cerca de 87% o radical hidroxil a partir da concentração de 150 µg/mL.

No entanto, é importante verificar se esta ação é devido a uma inibição do radical hidroxil ou de algum intermediário da reação de sua formação, pois a presença de fortes quelantes de metais e/ou de substâncias que reajam com

peróxido de hidrogênio ou ânion superóxido pode diminuir ou impedir a formação do radical hidroxil (HALLIWELL et al., 1987). Por este motivo a melanina foi ensaiada quanto à sua atividade quelante de Fe^{2+}, inibição do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio.

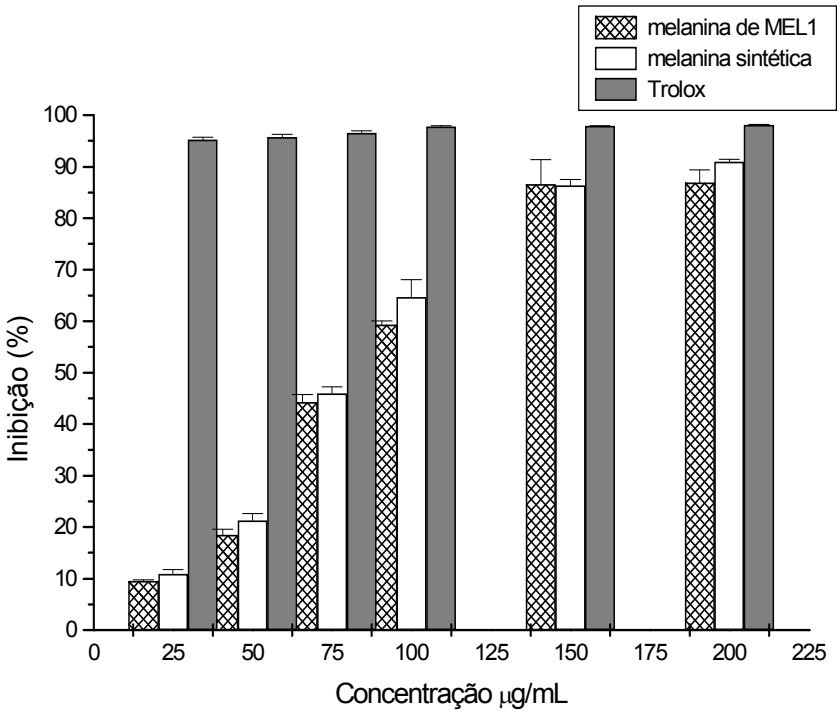


Figura 31 - Porcentagem de inibição da ação do radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) sobre a pentose na presença de diversas concentrações de pigmento do mutante MEL1, melanina sintética e Trolox (controle). Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

4.2.4.3 Análise do peróxido de hidrogênio

A toxicidade do peróxido de hidrogênio está mais relacionada à formação de oxidantes secundários como o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), embora, níveis de peróxido acima de 20 - 50 mg em alguns tipos celulares podem levar a citotoxicidade (GÜLÇIN, 2006).

Neste trabalho, a análise do peróxido de hidrogênio foi realizada usando o método de oxidação do vermelho de fenol mediada pela peroxidase, como descrito por PICK e KEISARI (1980). Neste ensaio é avaliada a capacidade da melanina em neutralizar o sistema peroxidase-H_2O_2 através da diminuição na formação do vermelho de fenol oxidado.

A figura 32 mostra a porcentagem de inibição da oxidação do vermelho de fenol em função das concentrações do pigmento extraído do mutante MEL1, da melanina sintética e do Trolox (controle). Os resultados obtidos mostram que a inibição é diretamente proporcional a concentração das melaninas em estudo, sendo que na concentração de 200 µg/mL a inibição foi de 81% e 88%, respectivamente, para a melanina extraído do fungo e a sintética. Estes resultados não foram estatisticamente diferentes como mostrado no apêndice 2.3. Para o trolox (controle), cerca de 90% de inibição foi conseguida na concentração de 50 µg/mL (Figura 32).

Anteriormente, nós já havíamos mostrado que o pigmento obtido de *A. nidulans* inibe a oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) pelo peróxido de hidrogênio em uma porcentagem em torno de 36% na concentração de 100 µg/mL, mostrando uma menor ação antioxidante (GONÇALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2005). Este resultado pode ser explicado pelo fato da reação com peróxido requerer condições alcalinas (WOLFRAM, 1970) que não estavam presentes no teste do TNB. No entanto, no teste realizado neste trabalho, obteve-se inibição do peróxido de hidrogênio de 56,5 % na concentração de 100 µg/mL, provavelmente devido ao aumento do pH reacional, que está em torno de 7,0.

Portanto, os resultados obtidos confirmam que a melanina extraída do mutante MEL1 apresenta atividade inibitória sobre o sistema peroxidase-H_2O_2, podendo provavelmente diminuir a ação peróxido de hidrogênio, impedindo sua

possível citotoxicidade, e a formação de oxidantes secundários, como por exemplo, o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$).

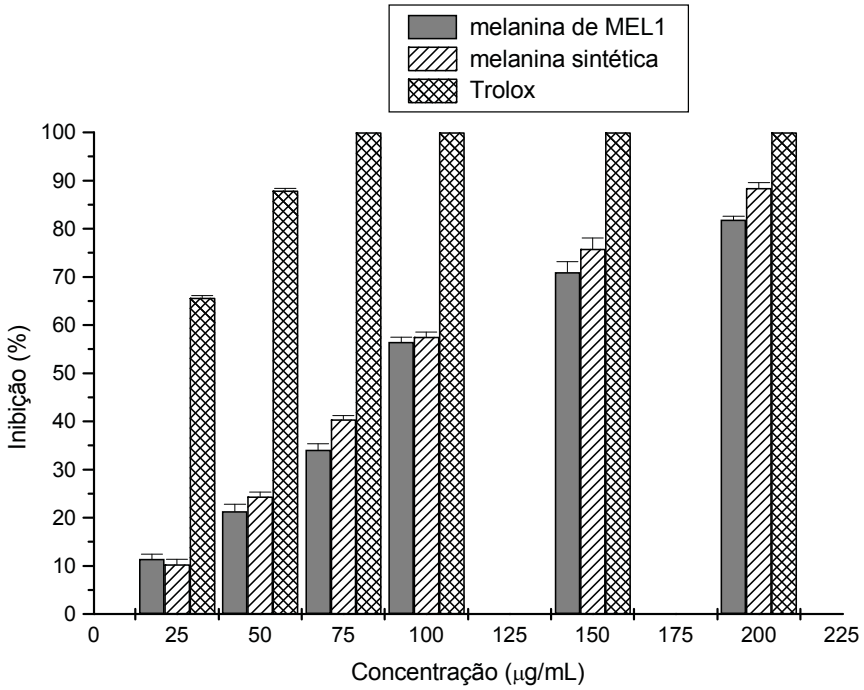


Figura 32 - Porcentagem de inibição da oxidação do vermelho de fenol por diferentes concentrações de melanina extraída do mutante MEL1, da melanina sintética e do trolox (controle antioxidante). Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

4.2.4.4 Atividade quelante de Fe^{2+}

Este teste foi realizado com o objetivo de verificar a capacidade da melanina de se ligar ao íon ferroso (Fe^{2+}), inativando sua ação. Entre os vários metais de transição, o ferro é conhecido como o mais importante pro-oxidante na oxidação de lipídios, devido a sua alta reatividade. Pode estimular a peroxidação lipídica pela formação de radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), através das reações de Haber-Weiss (equação 1) ou de Fenton (equação 2) ou também pode acelerar a peroxidação por decomposição de hidroperóxidos lipídicos em radicais peroxil e alcoxil (HALLIWELL, 1991; ARUOMA, 1996).

Equação 1

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \xrightarrow{Fe/Cu} O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$$

Equação 2

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$$

Os resultados obtidos neste ensaio, apresentados na figura 33, mostraram que a melanina extraída do mutante MEL1 exerce atividade quelante do Fe^{2+} proporcional ao aumento da sua concentração, sendo que 90% de quelação foi atingida na concentração de 100 µg/mL. Comportamento semelhante foi observado para a melanina sintética, sendo os resultados considerados estatisticamente iguais (Apêndice 2.3). No teste realizado com o EDTA (quelante de metais usado como controle), verifica-se que esta substância apresentou inibição do íon ferroso de cerca de 81% na concentrações acima de 100 µg/mL. Este resultado pode indicar que a melanina do fungo e a sintética exercem um efeito quelante superior ao EDTA.

Uma explicação para estes resultados seria a presença dos grupamentos hidroxila (OH), carboxila (COOH) ou carbonila (C=O) na estrutura das melaninas (Figuras 12 e 14), pois têm sido reportado que compostos contendo dois ou mais grupos funcionais, como: -OH, -SH, -COOH, $-PO_3H_2$, C=O, $-NR_2$, -S-, e -O-, em uma configuração favorável, podem apresentar atividade quelante de metais (GÜLÇIN, 2006).

Portanto, com os resultados obtidos podemos sugerir o pigmento tipo-melanina extraído do mutante MEL1 também pode ser considerado um antioxidante secundário, por interagir com metais de transição, diminuindo a formação de radical $OH^{\bullet}$ e consequentemente exercendo uma ação protetora sobre a deoxirribose do DNA e também no processo de peroxidação lipídica (ARUOMA, 2003; GÜLÇIN, 2006).

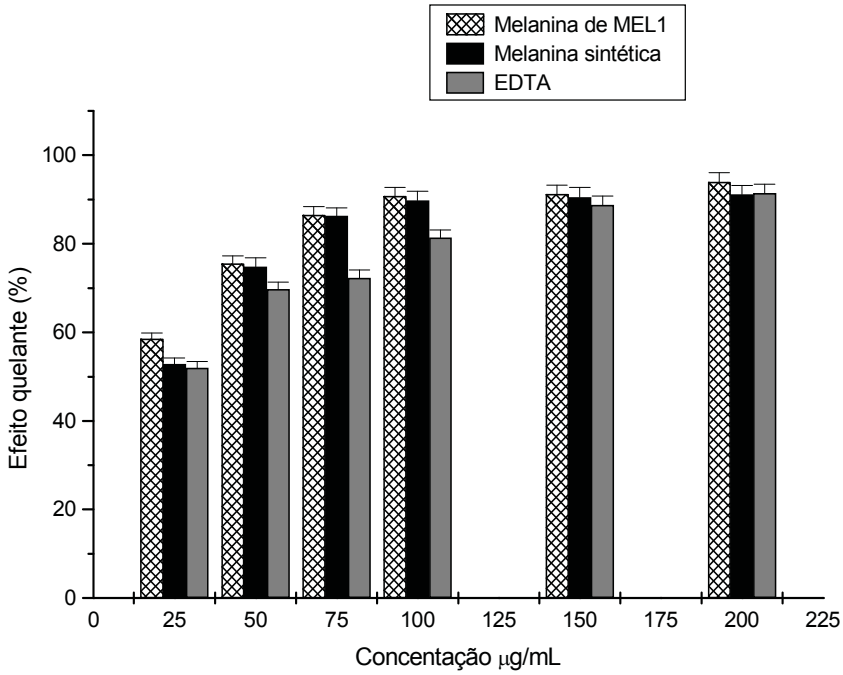


Figura 33 - Porcentagem de efeito quelante do íon Fe^{2+} na presença de diversas concentrações da melanina do mutante MEL1, melanina sintética e EDTA (controle). Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

4.2.4.5 – Reação com ânion superóxido

A atividade antioxidante da melanina frente ao ânion superóxido foi determinada através da diminuição da formação de ânion superóxido no sistema hipoxantina e xantina-oxidase (GÜLÇIN, 2006).

O gráfico apresentado na figura 34 mostra que a formação do ânion superóxido (medido pela abosorbância em 560 nm) diminuiu em função do tempo de maneira proporcional na presença da melanina extraída do mutante MEL1 e da melanina sintética.

Na figura 35 estão mostrados os resultados da porcentagem de inibição da formação do ânion superóxido após uma hora de reação na presença de várias concentrações de melanina extraída do mutante MEL1, da melanina sintética e do trolox (controle antioxidante). Os resultados obtidos mostram que na concentração de 200 μg/mL a melanina do fungo conseguiu inibir cerca de 85% a formação do ânion superóxido, enquanto a melanina sintética inibiu cerca de 79% e o trolox 88%. Os valores de IC_{50} calculados foram em torno de 72 e 49 μg/mL para a melanina de *A. nidulans* e melanina sintética, respectivamente. ZUGHAIER

et al. (1999) usando o pigmento tipo-melanina produzido pela levedura *Burkholderia cepacea,* também mostraram que a melanina inibe o ânion superóxido de maneira dependente da concentração, fornecendo um fator de proteção ao microorganismo contra radicais livres, o qual pode contribuir para a infecção em diversos organismos, aumentando sua patogenicidade.

Portanto, com os resultados obtidos podemos sugerir que o pigmento tipo-melanina presente no fungo *Aspergillus nidulans* apresenta atividade antioxidante efetiva contra o ânion superóxido comparável à melanina sintética e ao trolox. No entanto, é necessário estabelecer se a interage com o ânion superóxido diretamente ou se esta inibe a enzima xantina oxidase, impedindo sua atividade.

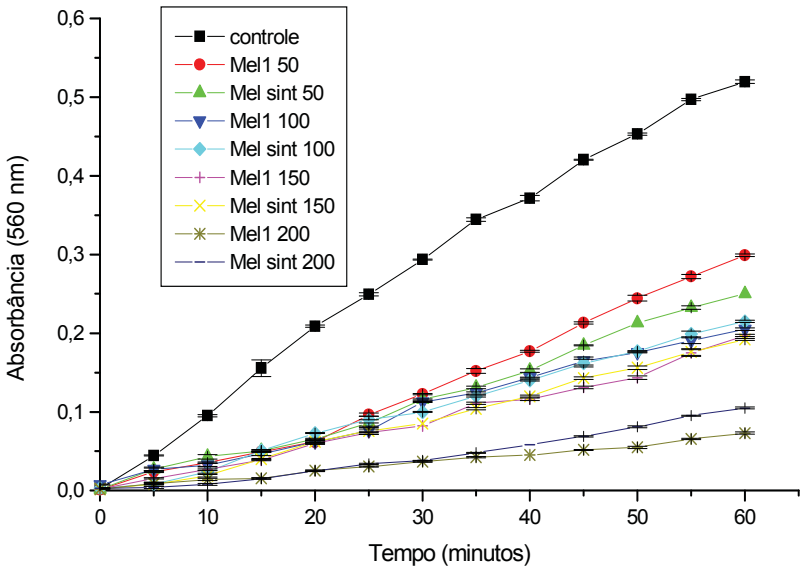


Figura 34 – Quantificação da formação do ânion superóxido na presença da melanina extraída do mutante MEL1 (Mel1) e da melanina sintética (Mel sint) em concentrações de 50, 100, 150 e 200 µg/mL em função do tempo. Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

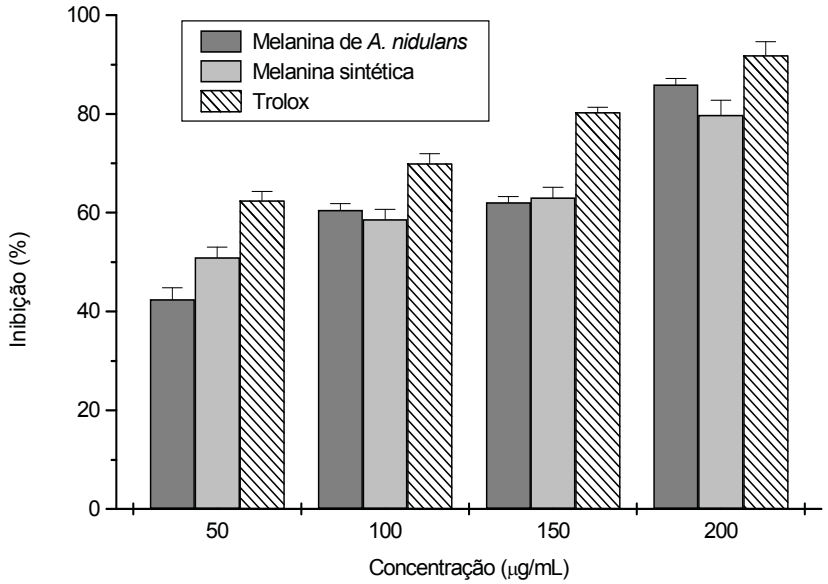


Figura 35 - Porcentagem de inibição da formação do ânion superóxido na presença de diferentes concentrações de melanina extraída do mutante MEL1, melanina sintética e Trolox (controle antioxidante). Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

4.2.4.6 Ensaio da atividade da xantina-oxidase

Para verificar a possibilidade do pigmento melanina inibir a enzima xantina oxidase, impedindo a conversão de xantina a ácido úrico, foi feito o ensaio espectrofotométrico descrito por MASUOKA et al. (2006). Neste ensaio é avaliada a formação do ácido úrico em uma mistura de reação, contendo xantina como substrato e a enzima xantina oxidase, através da medida da absorbância em 293 nm.

Na figura 36 podemos verificar que não houve alteração na formação de ácido úrico na presença de várias concentrações de melanina do mutante MEL1 e da melanina sintética, sendo que estes resultados não mostraram diferenças significativas em relação à formação de ácido úrico na ausência de melanina (Apêndice 2.3). Com isso podemos concluir que ambas as melaninas, na concentração de 200 µg/mL, não interferem na formação de ácido úrico e, portanto não apresentam nenhum efeito inibitório sobre a enzima xantina-oxidase. Drogas como o alopurinol que agem impedindo eficientemente a formação de ácido úrico,

apresentam 100% de inibição em concentrações de 100 µg/mL (LJUBUNCIC et al., 2005). Com este ensaio, fica evidente que a melanina não age sobre a formação do ânion superóxido.

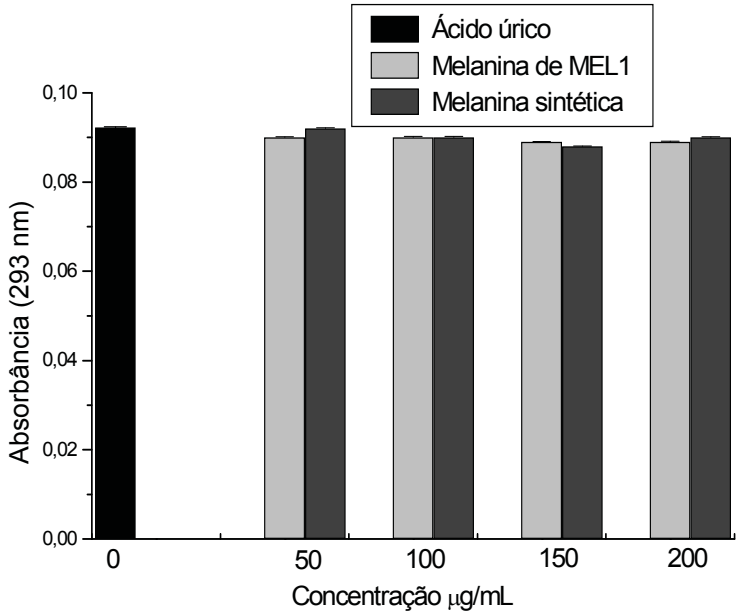


Figura 36 – Efeito de várias concentrações da melanina extraída do mutante MEL1, sobre a formação de ácido úrico (medido pela absorbância em 293 nm). Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

Os ensaios antioxidantes mostraram que a melanina do mutante MEL1 diminui os níveis do radical hidroxil, devido à interação direta entre melanina e radical hidroxil ou devido às sua atividade como quelante de metais, neutralizando ânion superóxido e interagindo com o sistema peroxidase-peróxido de hidrogênio podendo, portanto, impedir a formação deste radical.

4.2.5 Avaliação da resposta imunológica na presença da melanina

A pesquisa de substâncias naturais com propriedades imunomodulatórias pode ser feita através de ensaios *in vitro* de estimulação e supressão da produção de mediadores inflamatórios, como TNF-α e NO, pelos macrófagos.

4.2.5.1 Determinação da produção NO e TNF-α

Primeiramente, nos ensaios de resposta imunológica, foi verificado se ocorre ativação dos macrófagos na presença de melanina do mutante MEL1 através de microscopia óptica do processo de fagocitose.

A atividade fagocítica dos macrófagos pode ser demonstrada na presença de agentes estranhos à célula, chamados de antígenos, como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Durante este processo, ocorre um evento bastante complexo conhecido como ativação de macrófagos, onde ocorrem modificações funcionais, morfológicas e bioquimicas na célula (ADAMS; HAMILTON, 1984), as quais conferem eficiência na destruição de patógenos e células tumorais (COHN, 1978; KARNOVSKY; LAZDINS, 1978; KLIMP, 2001).

Os macrófagos ativados podem exercer a função de defesa de maneira direta, envolvendo liberação de vários mediadores inflamatórios, como o TNF-α, interleucina-1 (IL-1), eicosanóides, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NATHAN, 1987; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Ou podem agir de maneira indireta em atividades anti-tumorais e microbicidas, através da secreção de citocinas ou apresentação de antígenos, regulando o sistema imune (KLIMP et al., 2001). As interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral (TNF) mobilizam respostas imunes inatas e sinalizam linfócitos T, via IL-10, IL-12 e IL-18, a iniciar respostas específicas contra patógenos intra e extracelulares. Os linfócitos T por sua vez, liberam a principal molécula estimuladora de macrófagos, o interferon (IFN-γ) (MURTAUGH; FOSS, 2002).

Na figura 37 está mostrado macrófagos na presença e na ausência de melanina. Como pode-se observar nas figuras 37 C e D, a melanina está aderida à superfície celular e como conseqüência está levando à ativação dos macrófagos, causando alterações morfológicas, pois as células mostram-se maiores e com grande número de vacúolos endocíticos, comparados com as células controle (Figura 37 A). Estes resultados foram semelhantes ao observado para as células na presença de LPS (Figura 37 B).

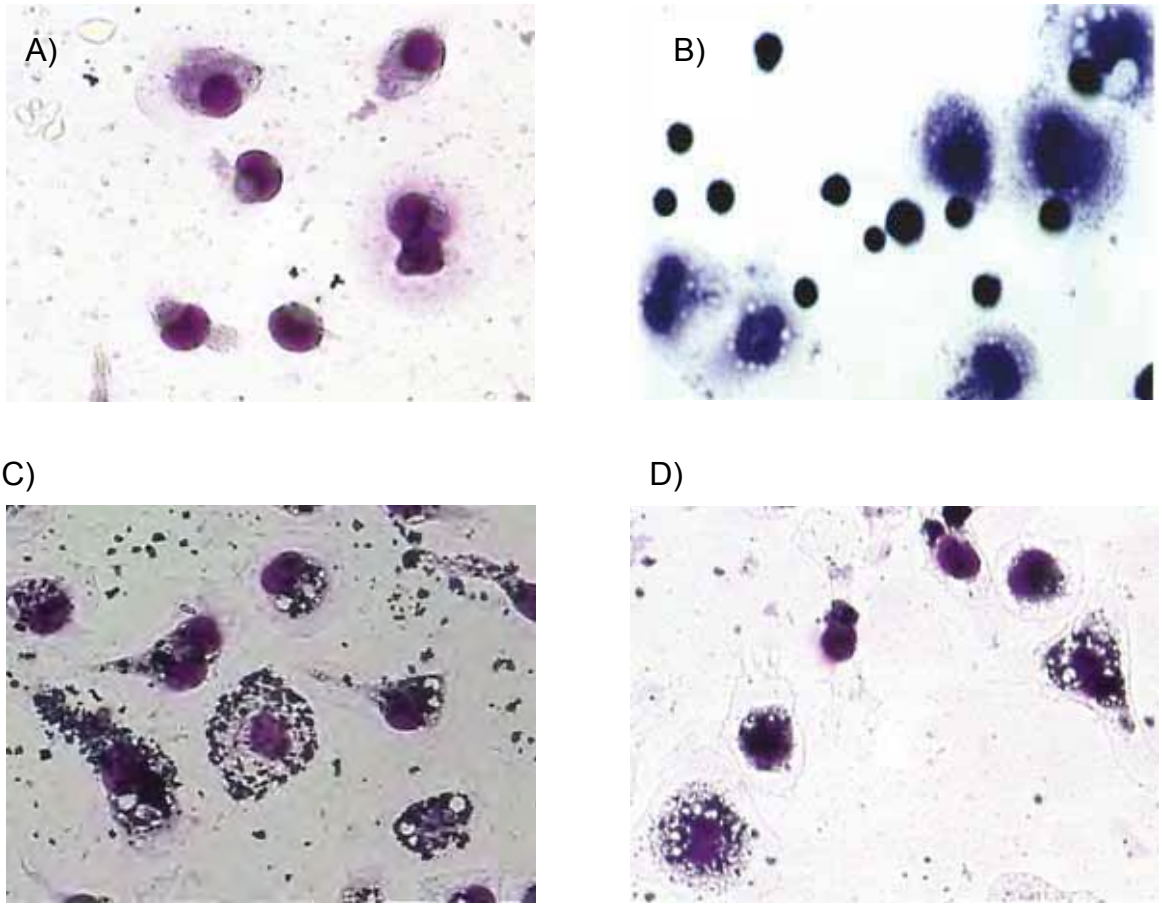


Figura 37 - Microscopia óptica de macrófagos (A), macrófagos na presença de melanina (C e D) utilizando a coloração de coloração de May-Grünwald e Giemsa e macrófagos na presença de LPS (B) corados com Giemsa [retirado de OLIVEIRA, (1994)].

BOCCA et al. (2006) mostraram que o fungo *Fonsecae pedrosoi* promove a ativação dos macrófagos, mas a presença da melanina na parede do fungo tem um efeito inibitório sobre a fagocitose e protege o este patógeno da destruição pela resposta imune.

Nos testes para detecção da produção de NO e TNF-α**,** torna-se necessário avaliar a viabilidade dos macrófagos, para excluir a possibilidade dos efeitos inibitórios serem devido à citotoxicidade da substância em estudo (melanina). Também foi avaliada a toxicidade da melanina sobre as células L929, pois quantificação de TNF-α é feita através de sua citotoxicidade sobre este tipo celular. Os resultados obtidos mostram que os macrófagos e as células L929 apresentam viabilidade acima de 90% na maior concentração de melanina ensaiada (100 µg/ml) (Figura 38), indicando a não citotoxicidade deste pigmento.

A concentração máxima de DMSO e LPS utilizada nos experimentos foram de até 2% e 5 µg/mL, respectivamente, estas não reduzem a viabilidade dos macrófagos e, também, não induzem produção e liberação de mediadores inflamatórios.

Os resultados referentes à produção de TNF-α (Figura 39) mostraram que embora a melanina do fungo promova uma ativação dos macrófagos, este pigmento induziu um aumento pequeno na concentração deste mediador celular comparado ao controle negativo (células sem melanina), sendo não significativo pela análise estatística (apêndice 2.3). Em relação ao efeito da melanina na indução do NO (Figura 40) observa-se que não ocorreu aumento proporcional a aconcentração de melanina. A ausência na produção de NO, pode ser explicada devido à melanina não aumentar significativamente os níveis de TNF-α, pois esta citocina, juntamente com interferon–γ, interleucinas IL-1 e IL-6, são potentes indutores da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela síntese do óxido nítrico em macrófagos.

Estes dados sugerem, portanto, que a melanina não estimulou de maneira acentuada a produção dos mediadores TNF-α e NO, o que possibilita seu uso em formulações farmacêuticas.

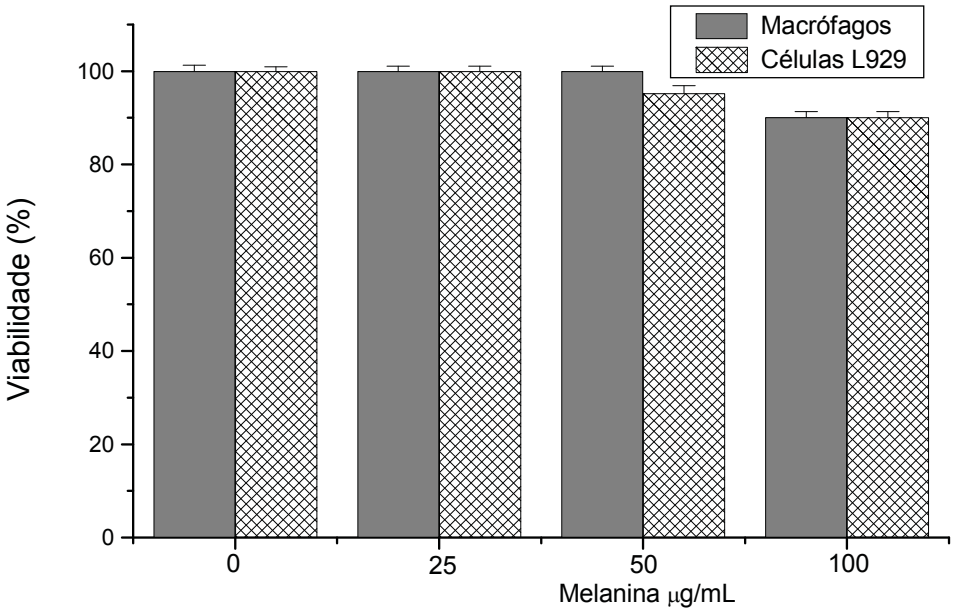


Figura 38 – Efeito de diferentes concentrações de melanina extraída do mutante MEL1 na viabilidade de macrófagos peritoneais e da célula L929. Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

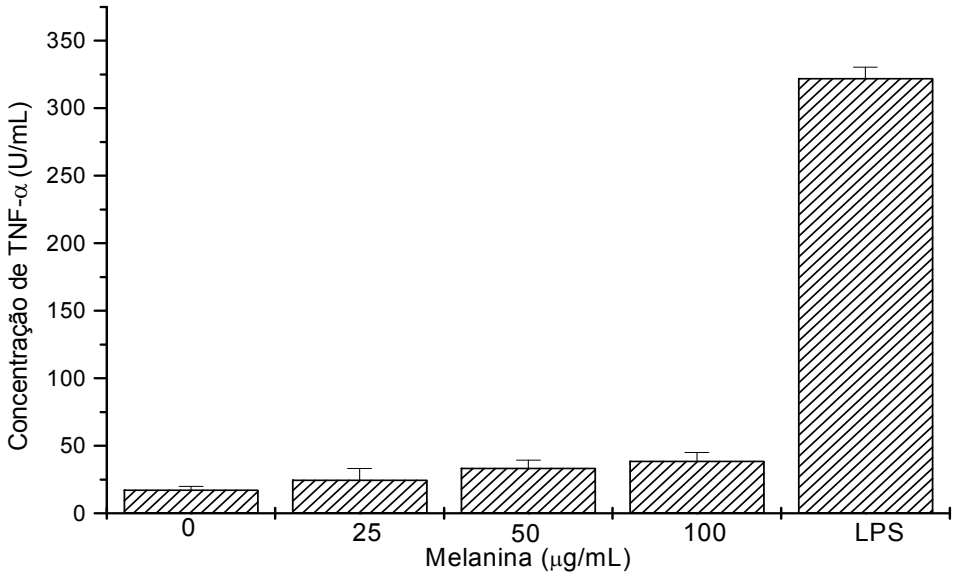


Figura 39 – Produção de TNF-α por cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de diferentes concentrações de melanina extraída de fungo *A. nidulans*. LPS foi utilizado como controle positivo. Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

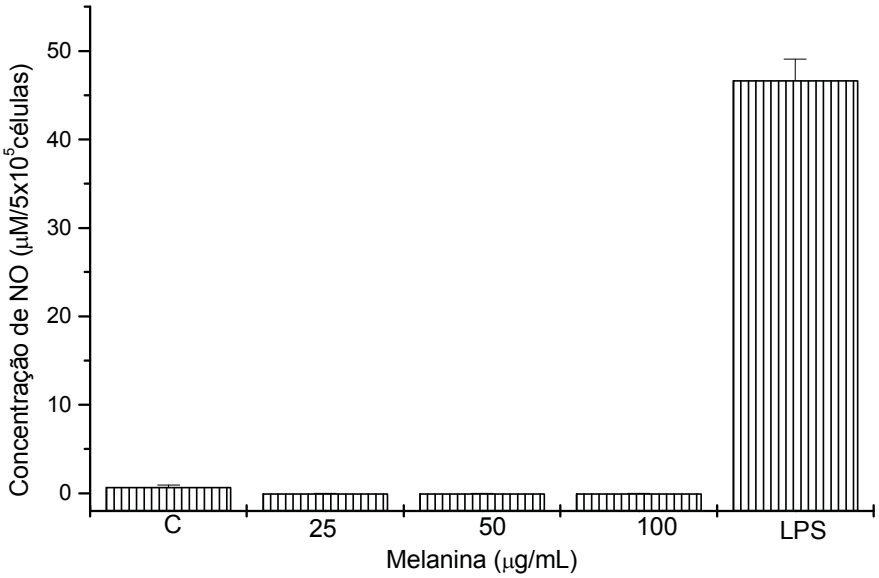


Figura 40 – Produção de NO por cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de diferentes concentrações de melanina extraída de fungo *A. nidulans*. LPS foi utilizado como controle positivo. Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

4.9.2 Determinação da atividade inibitória na produção de NO e TNF-α

O efeito da melanina na supressão dos mediadores NO e TNF-α foi avaliado devido ao interesse na descoberta de novos fármacos inibidores de citocinas, os quais podem ser usados no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, incluindo doenças auto-imunes, choque séptico, colite ulcerativa, câncer e AIDS (SCHÜMANN; TIEGS, 1999; BOUSHEY; KATSUNG, 2006), tornou-se interessante verificar.

Como pode ser observado na figura 41 ocorreu uma inibição na produção de NO dependente da concentração, sendo que na concentração de 100 μg/mL, a melanina alcança níveis de 83%, demonstrando sua ação imunomoduladora.

Com relação ao TNF-α (Figura 42) os resultados foram semelhantes mostrando que houve inibição na sua produção dependente da concentração da melanina. No entanto, comparado ao NO, o nível de inibição foi menor, pois em 100 μg/mL houve apenas 55% de inibição. Este resultado mostra que a melanina não exerce um efeito inibitório completo na produção de TNF-α, ocorrendo uma discreta produção.

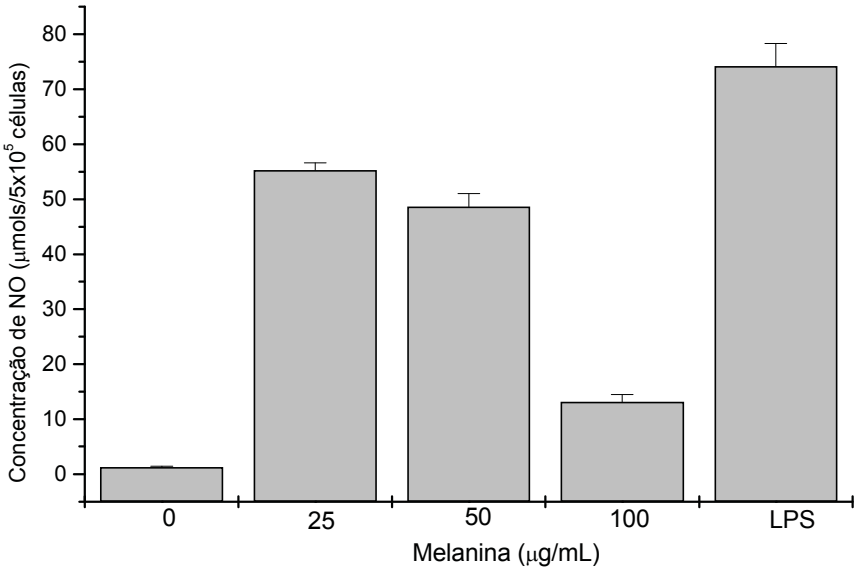


Figura 41 - Efeitos das diferentes concentrações de melanina extraída do mutante MEL1 na produção de NO por cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. A solução de LPS foi utilizado como controle positivo. Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

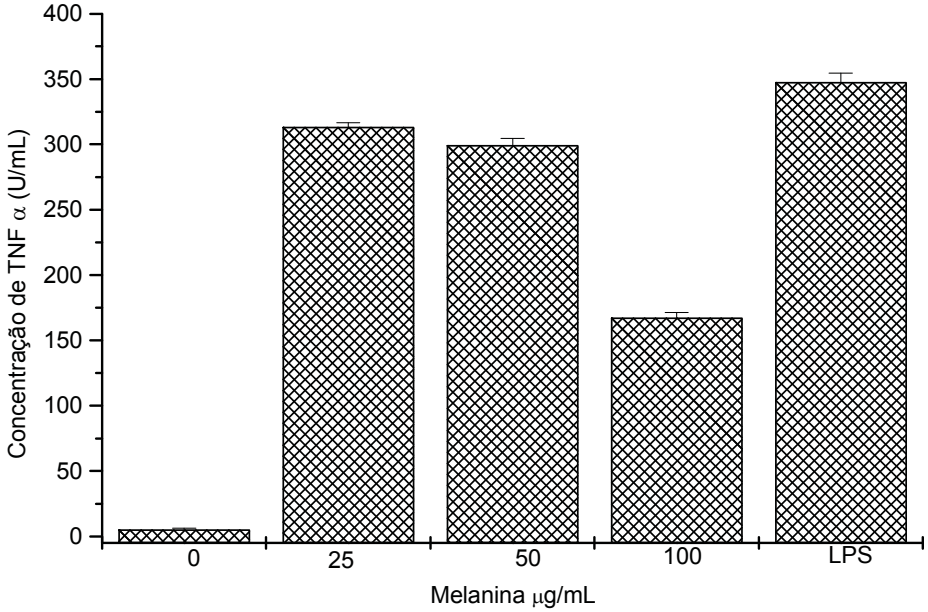


Figura 42 - Efeitos das diferentes concentrações de melanina extraída do mutante MEL1 na produção de TNF-α por cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Solução de LPS foi utilizada como controle positivo. Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

O fato da melanina do fungo inibir a produção de NO, pode ter ocorrido devido à inibição de TNF-α, associado a uma inibição direta da iNOS, ou associado com inibição na produção dos indutores da iNOS como IFN-γ, IL-1 ou

IL-6. Também pode ser devido a uma neutralização direta do NO formado, pois embora o óxido nítrico seja um radical livre relativamente estável, ele reage prontamente com outros radicais livres, como as melaninas (THOMAS, 2003).

MOHAGHEGHPOUR et al. (2000) mostraram que a melanina sintética, produzida por oxidação por tirosinase a partir de tirosina, diminuia a produção de algumas citocinas, entre elas IL-1 e IL-6, além de TNF-α, desempenhando assim um papel protetor contra resposta inflamatória. Resultados semelhantes foram encontrados por WANG e MAZZA (2002), demonstrando que vários compostos polifenólicos, semelhante à melanina, suprimiram a liberação de NO em cultura de macrófagos estimulados com LPS e interferon-γ (IFN- γ). BOCCA et al. (2006) também mostraram que durante a infecção pelo fungo *F. pedrosoi*, macrófagos são incapazes de produzir NO, mesmo após estimulação com LPS e IFN- γ.

Os resultados dos testes de avaliação da resposta imunológica da melanina extraída do mutante MEL1 indicam que este pigmento possui um grande potencial imunomodulador, pois age como um potente inibidor da produção de NO, sendo que também acarreta uma diminuição na produção de TNF-α.

5 – CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que a melanina extraída do mutante MEL1 do fungo *A. nidulans*:

- Apresenta na sua estrutura duas grandes unidades com grupamentos diidroxindol e anéis pirrólicos substituídos, representadas pelos fragmentos de massas moleculares igual a 573 e 550 u.m.a.
- Mostra baixa citotoxicidade (na presença ou não da fração S-9) em comparação com agentes citostáticos como a cisplatina, epirubicina e a ciclofosfamida.
- Não apresenta propriedades mutagênicas quando ensaiada com as linhagens TA 98, TA 100 e TA 102 *de S. typhimurium* principalmente se for usada em formulações cosméticas para aplicação tópica.
- Não apresenta efeito antimicrobiano frente a *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*.
- Neutraliza espécies reativas como o radical hidroxil, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio e apresenta forte efeito quelante.
- Comporta-se como um radical livre, pois apresenta elétrons livres desemparelhados na estrutura.
- Não induziu a liberação do mediador inflamatório NO.
- Mostrou ser um potente inibidor da produção de NO e também acarretou uma diminuição na produção de TNF-α.

Com os estudos realizados neste trabalho, podemos considerar que a melanina extraída do fungo *Aspergillus nidulans* apresenta potencial biotecnológico como matéria-prima cosmética, em função das suas atividades antioxidante e imunomoduladora.

REFERÊNCIAS

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 283 - 318, 1984.

ALLEGRA, G.; ARBAN, R.; COSTA, C.; BIASIOLO, M.; CURCURUTO, O.; POZZAN, A.; TRALDI, P. Fast atom bombardment mass spectrometry in the study of dopamine melanogenesis intermediates. **Pigment Cell Res.**, v. 4, p. 181 - 186, 1990.

ARUOMA, O. I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 5, p. 675 - 705, 1996.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant food. **Mut. Res.**, v. 9455, p. 1 - 12, 2003.

AUGUSTO, O. **Radicais livres**: bons, maus e naturais. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. 115 p.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Applictions of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology. **ATLA J.**, v. 18, p. 129 - 144, 1990.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33 - 44, 2000.

BACON, J. A.; LINSEMAN, D. A.; RACZNIAK, T. J. *In vitro* cytotoxicity of tetracyclines and aminoglycosides in LLC-PK, MDCK and Chang continuous cell lines. **Toxic. In Vitro**, v. 4, p. 384 - 388, 1990.

BALDAIA, C.; PORTELA, F.; ANDRADE, P.; LEITÃO, M. C.; FREITAS, D. Doença de Crohn: TNF-α e outras citocinas. **J. Port. Gastrenterol.**, v. 9, p. 187 - 195, 2002.

BARILE, F. A. **Introduction to *in vitro* cytotoxicology**: mechanisms and methods. Boca Raton: CRC Press, 1994. 222 p.

BARNUM, S. R. **Biotechnology**: an introduction. Belmont: Wadsworth Publishing, 1998. 350 p.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **As bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosyntesis and functions of fungal melanins. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 24, p. 411 - 451, 1986.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **J. Biotechnol.**, v. 66, p. 101 - 107, 1998.

BERTAZZO, A.; COSTA, C.V. L.; ALEGRIN, G.; SCHIAVOLIN, M.; FAVRETTO, D.; TRALDI, P. Enzymatic oligomerization of tyrosine by tyrosinase and peroxidase studied by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom**., v. 13, p. 542 - 547, 1999.

BILINSKA, B. Progress of infrared investigations of melanin structures. **Spectrochim. Acta Part A**, v. 52, p. 1157 - 1162, 1996.

BLOIS, M. S. The melanins: their synthesis and structure. **Photochem. Photobiol**. **Rev.**, v. 3, p. 115 - 134, 1978.

BLOOMFIELD, B. J.; ALEXANDER, M. Melanins and resistance of fungi to lysis. **J. Bacteriol.**, v. 93, n. 4, p. 1276 - 1280, 1967.

BOCCA, A. L.; BRITO, P. M. S.; FIGUEIREDO, F.; TOSTA, C. E. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Mycopathol.**, v. 161, p. 195 - 203, 2006.

BONNER, T. G.; DUNCAN, A. Infra-red spectra of some melanins. **Nature**, v. 194, p. 1078 - 1079, 1962.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, v. 24, p.119 - 124, 1985.

BOREUNFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays – the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxic. In Vitro**, v. 2, p. 1 - 6, 1988.

BOUSHEY, A. H.; KATZUNG, B. G. Drogas utilizadas na asma. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 20, p. 269 - 282.

BRIDELLI, M. G.; TAMPELLINI, D.; ZECCA, L. The structure of neuromelanin and its iron binding site studied by infrared spectroscopy. **FEBS Letters**, v. 457, p.18 - 22, 1999.

BULL, A. T. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. **J. Gen. Microbiol.**, v. 63, p. 75 - 94, 1970.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 573 - 606, 2000.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Can. J. Microbiol.**, v. 44, p. 1115 - 1136, 1998.

BUZMAN, E.; PILAWA, B.; WITOSZYNSKA, T.; LATOCHA, M.; WILCZOK, T. Effect of Zn^{2+} and Cu^{2+} on free radicals properties of melanin from *Cladosporium cladoporioides*. **Appl. Magn. Reson.**, v. 24, p. 401 - 407, 2003.

BYSHNEVA, L. N.; SENCHUK, V. V. Effects of melanins on lipid peroxidation. **App. Biochem. Microbiol.**, v. 37, p. 93 - 97, 2001.

CHÁVEZ, J. H.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; BARARDI, C. R. M.; PINTO, A. R.; SIMÕES, C. M. O; ZANETTI, C. R. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and dervatives against rabies vírus. **Veter. Microbiol.**, v. 116, p. 53 - 59, 2006.

CLUTTERBUCCK, A. J. The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus nidulans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 136, p. 1731 - 1738, 1990.

COHN, Z. A. The activation of mononuclear fagocytes: fact, fancy, and future. **The Journal of Immunol.**, v.121, n.3, p.813 - 816, 1978.

COLE, R. B. **Electrospray mass spectrometry**: fundamentals, instrumentation & applications. New York: John Wiley & Sons, 1997. 1234 p.

COMMONER, B.; TOWNSEND, J.; PAKE, G. E. Free radicals in biological materials. **Nature**, v. 174, p. 689 - 691, 1954.

CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 274 - 277, 1996.

COSTA, M. T.; FABENI, R. C.; APTEKAMNN, K. P.; MACHADO, R. R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciênc. Rural**, v. 33, p. 967 - 974, 2003.

COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 113, p. 51 - 56, 1966.

CROTTI, A. E.; VESSECHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por *Electrospray*: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quim. Nova**, v. 29, p. 287 - 292, 2006.

CRUZ, A.; CARVALHO, E. M. Introdução à imunofarmacologia. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 51, p. 523 - 525.

CURVALL, M.; FLORIN, I.; JANSSON, T. Mutagenicity of some indoles and related compounds in the Ames test. **Toxicology**, v. 23, p. 1 - 10, 1982.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **J. Immun. Meth.**, v. 232, p. 3 - 14, 1999.

DEVIENNE, K. F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturasi e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides*.** 2000. 127 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Braz. J. Microbiol**., v. 33, p.166 - 168, 2002.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W. *In vitro* cytotoxicity of some natural and semi-synthetic isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 85 - 88, 2002.

DOERING, T. L.; NOSANCHUK, J. D.; ROBERTS, W. K.; CASADEVALL, A. Melanin as potential cryptococcal defence against microbicial proteins. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 175 - 178, 1999.

EIGLER, A.; SIEGMUND, B.; EMMERICH, U.; BAUMANN, K. H.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. **J. Leukoc. Biol.**, v. 63, p. 101 - 107, 1998.

ELLIS, D. H.; GRIFFITHS, D. A. The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. **Can. J. Microbiol.**, v. 20, p. 1379 - 1386, 1974.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711 - 713, 1998.

FEDER, L. S.; LASKIN, D. L. Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide prodution by GM-CSF, M-CSF and IL-1 β following acute endotoxemia. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55, p. 507 - 513, 1994.

FENGLIN, H.; RUILI, L.; BAO, H.; LIANG, M. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, p.14 - 25, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61 - 68, 1997.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 46, p. 265 - 271, 2000.

FOGARTY, R. V.; TOBIM J. M. Fungal melanins and their interactions with metals. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 19, p. 311 - 317, 1996.

GARZA-OCANAS, L.; HSIEH, G. C.; ACOSTA, D.; TORRES-ALANÍS, O.; PINEYRO-LÓPEZ, A. Toxicity assessment of toxins T-514 and T-544 of buckthorn (*Karwinskia*

humboldtiana) in primary skin and liver cell cultures. **Toxicology**, v. 73, p. 259 - 267, 1992.

GASKELL, S. J. Electrospray: principles and practice. **J. Mass Spectrom.**, v. 32, p. 677 - 688, 1997.

GOLDURAN, G. H.; MORRIS, R. N. *Aspergillus nidulans* as a model system for cell and molecular biology studies. **Methods Mol. Genetics**, v. 6, p. 48 - 65, 1995.

GÓMEZ, B.; NOSANCHUK, J. D.; DÍEZ, S.; YOUGCHIM, S.; AISEN, P.; CANO, L. E.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal patoghen *Paracoccidoiides brasiliensis in vitro* and during infection. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5760 - 5767, 2001.

GONÇALVES, R. C. R.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Antioxidant acitivity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans.* **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p. 1129 - 1131, 2005.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. **Analytic. Biochem.**, v. 126, n. 1, p.131 - 138, 1982.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2 nd ed. New York: Willey-Liss, 1994. 458 p.

GÜLÇIN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life Sci.**, v. 78, p. 803 - 811, 2006.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochem. Pharmac.**, v. 49, n. 10, p. 1341 - 1348, 1995.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am. J. Med.**, v. 91, p. 14S - 22S, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals reactive species and toxicology. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 544 - 616.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Anal. Biochem.**, v. 165, p. 215 - 219, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 1 - 85, 1990.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3007 - 3017, 1998.

HARSANYI, Z. P.; POST, P.W.; BRINKMANN, J. P.; CHEDEKEL,M. R.; DEIBEL, R. M. Mutagenicity of melanin from human red hair. **Experientia**, v. 36, p. 291 - 292, 1980.

ITO, S.; FUJITA. K. Microanalysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanonas by chemical degradation and liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, v. 144, p. 527 - 536, 1985.

JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 708 - 717, 2000.

JACOBSON, E. S.; HOVE, E.; EMERY, H. S. Antioxidant function of melanin in black fungi. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 4, p. 4944 - 4945, 1995.

JACOBSON, E. S.; TINNEL, S. S. Antioxidant function of fungal melanin. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7102 - 7104, 1993.

JAHN, B.; BOUKHALLOUK, F.; LOTZ, J.; LANGFELDER, K.; WANNER, G.; BRAKHAGE, A. A. Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 6, p. 3736 - 3739, 2000.

JANG, D. S.; KANG, B.; RYU, S. Y.; CHANG, I.; MIN, K. R.; KIM, Y. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, p.705 - 712, 1999.

KALKA, K.; MUKHTAR, H.; TUROWSKI-WANKE, A.; MERK, H. Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v. 13, p. 143 - 149, 2000.

KARNOVSKY, M. L.; LAZDINS, J. K. Biochemical criteria for activated macrophages.**The Journal of Immunol.**, v.121, n.3, p.809 - 813, 1978.

KAYSER, H.; PALIVAN, C. G. Stable free radicals in insect cuticles: electron spin resonance spectroscopy reveals differences between melanization an sclerotization. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 453, p. 179 - 187, 2006.

KIRIKAE, T.; OJIMA, I.; KIRIKAE, F.; MA, Z.; KUDUK, S. D.; SLATER, J. C.; TAKEUCHI, C. S.; BOUNAUD, P. Y.; NAKANO, M. Structural requirements of taxoids for nitric oxide and tumor necrosis factor production by murine macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 227, p. 227 - 235, 1996.

KLAASSEN, C. D. Princípios da toxicologia e tratamento do envenenamento. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. Cap. 4, p. 51 - 61.

KLIMP, A. H.; VRIES, E. G. E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Oncol. Hematol.**, v. 44, p. 143 - 161, 2002.

KNÖRLE, R.; SCHINIZ. E.; FEUERSTEIN, T. J. Drug accumulation in melanin: an affinity chromatographic study. **J. Chromatography B**, v. 714, p. 171 - 179, 1988.

KRISHNA, G.; URDA, G.; THIESS, J. Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies: a pharmaceutical industry perspective. **Environ. Mol. Mutagen**., v. 32, n. 2, p. 115 - 120, 1998.

KUBO, Y.; SUZUKI, K.; FURUSAWA, I.; YAMAMOTO, M. Melanin biosíntesis as a prerequesite for penetration bu appressoria of *Colletotrichum lagenarium*: site of inhibition bu melanin-inhibiting fungicides and their actino on appressoria. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 23, p. 47 - 55, 1985.

KUO, M. J.; ALEXANDER. M. Inhibition of the lysis of fungi by melanins. **J. Bacteriol.**, v. 94, n. 3, p. 624 - 629, 1967.

LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid nd its pharmacological antagonism: na update picture. **Gen. Pharmac.**, v. 27, n. 7, p.1145 - 1147, 1996.

LAPPONI, J. C. **Estatística**: usando Excel 5 e 7. São Paulo: Lapponi, 1997. 420 p.

LARSSON, B. S. Interaction between chemicals and melanin. **Pigment Cell Res.**, v. 6, p. 127 - 133, 1993.

LASKIN, D. L.; HECK, D. E.; GARDNER, C. R.; FEDER, L. S.; LASKIN, J. D. Distinct patterns of nitric oxide prodution in hepatic macrophages and endothelial cells folling acute exposure of rats to endotoxin. J. Leukoc. Biol.**, v. 56, p. 751 - 758, 1994.**

LEVI, E. P. Reactive metabolites and toxicity. In: HODGSON, E.; LEVI, P. E. (Ed.). **Introduction to biochemical toxicology**. Connecticut: Appleton e Lange, 1994. p. 219 - 239.

LISBOA, H. C. Estudo das condições de cultivo na produção de pigmento melanina pelo mutante do fungo *Aspergillus nidulans***. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.**

LIU, Q.; SUZUKI, K.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Antioxidant activites of natural 9-cis and synthetic all-trans β-carotene assessed by human neutrophil chemiluminescence. **Nutr. Res.**, v. 20, n. 1, p. 5 - 14, 2000.

LJUBUNCIC, P.; AZAIZEH, H.; PORTNAYA, I.; COGAN, U.; SAID, O.; ABU-SALEH, A. Bomzon. Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p. 43 - 47, 2005.

MacMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Imunnol.**, v. 15, p. 323 - 350, 1997.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficência renal crônica. **Rev. Nutr.**, v. 12, p. 205 - 212, 1999.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mut. Res.**, v. 113, p. 173 - 215, 1983.

MARSHALL, K.; REITER, R. J.; POEGGELER, B.; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin *in vitro*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 21, n. 3, p. 307 - 315, 1996.

MARTINELLI, S. D.; BAINBRIDGE, B. W. Phenoloxidases of *Aspergillus nidulans* **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 63, p. 361 - 370, 1974.

MASUOKA, N.; NIHEL, K.; KUBO, I. Xanthine oxidase inhibitory activity of alkyl gallates. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 50, p. 725 - 731, 2006.

MIMURA, T.; ITOH, S.; TSUJIKAWA, K.; NAKAJIMA, H.; SATAKE, M.; KOHAMA, Y.; OKABE, M. Studies on biological activities of melanin from marine animals. V. anti-inflamatory activity of low-molecular-weight melanoprotein from Squid (Fr. SM II) **Chem. Pharm. Bull**., v. 35, p. 1144 - 1150, 1987.

MIRANDA, M.; LIGAS, C.; AMICARELLI, F.; ALESSANDRO, E. D.; BRISDELLI, F.; ZARIVI, O.; POMA, A. Sister chromatid exchange (SCE) rates in human melanoma cells as an index of mutagenesis. **Mutagenesis**, v. 12, p. 233 - 236, 1997.

MOHAGHEGHPOUR, N.; WALEH, N.; GARGER, S. J.; DOUSMAN, L.; GRILL, L. K.; TUSÉ, D. Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. **Cell. Immunol.**, v. 199, p. 25 - 36, 2000.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, pharmacology. **Pharmacol. Rev**., v. 43, p. 109 - 142, 1991.

MOREIRA NETO, J. J. S. Estudo *in vitro* da viabilidade de células mantidas em diferentes meios de conservação e tempo de exposição. **1999. 107 f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.**

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GÓMEZ, B. L.; AISEN, P.; HAY, R. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Synthesis of melanin-like pigment by *Sporothrix shenckii in vitro* and during mammalian infection. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4026 - 4033, 2003.

MOURA, H. V.; POMERANTZEFF, P. M.; GOMES, J. W. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc**., v. 16, p. 376 - 387, 2001.

MURTAUGH, M. P.; FOSS, D. L. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. **Veter. Immunol. Immunopathol.**, v.87, p.109 - 121, 2002.

NAPOLITANO, A.; PEZZELLA, A.; PROTA, G. Structural analysis of synthetic melanins from 5,6-dihydroxindole by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 10, p. 468 - 472, 1996.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 319 - 326, 1987.

NICOLAUS, R. A.; PIATELLI, M.; FATTORUSSO, E. The structure of melanins and melanogenesis-IV. **Tetrahedron**, v. 20, p. 1163 - 1172, 1964.

NOSANCHUK J. D.; ROSAS A. L.; CASADEVALL, A. The antibody to fungal melanin in mice. **J. Immunol.**, v. 160, p. 6026 - 6031, 1998.

NOSANCHUK, J. D.; VALADON, P.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococus neoformans* in murine infection. **Molec. Cel. Biol.**, v. 19, p. 745 - 750, 1999.

ODEH, M. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-α theory. **Eur. J. Clin. Res**., v. 37, p. 291 - 304, 2007.

OLIVEIRA, C. A. **Estudo sobre a indução da fagocitose de imunocomplexos de C3b ou IgM homóloga por macrófagos peritoneais de camundongos.** 1994. 161 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1994.

OSMANI, S.; MIRABITO, P. M. The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans.* **Fungal Genetics Biol.** v. 41, p. 401 – 410, 2004.

PAIM, S.; LINHARES, L. F.; MANGRICH, A. S.; MARTIM, J. P. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. **Biol. Fertil. Soils**, v. 10, p. 72 - 76, 1990.

PARIJ, N.; NAGY, A. M.; FONDU, P.; NEVE, J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils. **Eur. J. Pharmacol**., v. 352, p. 299 - 305, 1998.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology:**The basic science of poisons. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1998. p. 113 - 186.

PATEL, K. R.; WYMAN, J. A.; PATEL, K. A.; BURDENS B. J. A mutant of Bacillus thurigiensis producing a dark-brown pigment with increased UV resistance and insecticidal activity. **J. Invert. Pathol.**, v. 67, p, 120 - 124, 1996.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, v. 38, p. 161 - 170, 1980.

PLONKA, M. P.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. **Acta Biochim. Pol**., v. 53, p. 429 - 443, 2006.

POMBEIRO, S. R. C. **Controle da expressão gênica do transporte e metabolismo de fontes de nitrogênio em *Aspergillus nidulans***: influência da concentração de nitrito, do pH e da presença de citrato. 1991. 130 f. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1991.

POTGIETER, H. J.; ALEXANDER, M. Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis. **J. Bacteriol.**, v. 91, p. 1526 - 1532, 1966.

PRIOR, R. L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p.1173 - 1181, 1999.

PROTA, G. Melanins and melanogenesis: recent applications and perspectives. **Cosmet. Toilet.**, v. 111, p. 43 - 51, 1996.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 904 p.

RIDDELL, R. J.; CLOTHIER, R. H.; BALLS, M. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. **Chem. Toxicol.**, v. 24, p. 469 - 471, 1986.

RILEY, P. A. Melanin. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 29, p. 1235 - 1239, 1997.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, v. 6, p. 317 - 320, 2003.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Fundamentos de Imunologia**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 504 p.

ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D.; FELDMESSER, M.; COX, G. M.; McDADE, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2845 - 2853, 2000.

SADIK, G.; SATTAR, M. A.; ASTAK MOHAL KHAN, G. R. M. Antimicrobial activity of extracts and a glycoside from *Vanda roxburghii* Br. **Pakistan J. Biol. Sciences**, v. 5, p. 189 - 191, 2002.

SARIH, M.; SOUVANNAVONG, V.; ADAM, A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 191, p. 503 - 508.

SAVA, V. M.; GALKIN, B. N.; HONG, M. Y.; YANG, P. C.; HUANG, G. S. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immuno-stimulating activity. **Food Res. Intern.**, v. 34, p. 337 - 343, 2001.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, G. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 1999. Cap. 15, p. 291- 320.

SCHÜMANN, J.; TIEGS, G. Pathophysiological mechanisms of TNF during intoxication with natural or man-made toxins. **Toxicology**, v. 138, p. 103 - 126, 1999.

SENESI, N.; MIANO, T. M.; MARTIN, J. P. Elemental, funcional infrared and free radical characterization of humic acid-type fungal polymers (melanins). **Biol. Fertil. Soils**, v. 5, p. 120 -125, 1987.

SHCHERBA, V. V.; BABITSKAYA, V. G.; KURCHUNKO, V. P.; IKONNIKOVA, N, V.; KUKULYANSKAYA, T. A. Antioxidant properties of fungal melanin pigments. **App. Biochem. Microbiol.**, v. 36, p. 491 - 495, 2000**.**

SHIVPRASAD, S.; PAGE, W. J. Catechol formation and melanization by Na-dependent *Azotobacter chroococum*: a protective mechanism for aeroadaptation? **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 55, n. 7, p. 1811 - 1817, 1989.

SHRIVASTAVA, R.; DELOMENIE, C.; CHEVALIER, A.; JOHN, G.; EKWALL, B. Comparison of *in vivo* acute lethal potency and *in vitro* cytotoxicity of 48 chemicals. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 8, p. 157 - 170, 1992.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1374 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 1999. 821 p.

SOTO-CERRATO, V.; LLAGOSTERA, E.; MONTANER, B.; SCHEEFER, G. L. Mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells by the anticancer agent prodigiosin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 1345 - 1352.

STREGE, M. A. High-performance liquid chromatographic–electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. **J. Chromat. B**: Biomedical Sciences and Applications, v. 725, p. 67-78, 1999.

TAYLOR, P. C. Anti-TNF-α therapy for Reumathoid Arthritis: an update. **Internal Med.**, v. 42, p. 15 - 20, 2003.

THOMAS, G. **Química medicinal**: uma introdução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413 p.

TRAN, M. L.; POWELL, B. J.; MEREDITH, P. Chemical and structural disorder in eumelanins: a possible explanation for broadband absorbance. **Biophys. J.**,v. 90, p. 743 - 752, 2006.

TSAI, H.; FUJII, I.; WATANABE, A.; WHEELER, M. H.; CHANG, Y. C.; YASUOKA, Y.; EBIZUKA, Y.; KWON-CHUNG, K. J. Pentaketide melanin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* requires chain-length shortening of a heptaketide precursor. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 31, p. 29292 - 29298, 2001.

URABE, K.; AROCA, P.; TSUKAMOTO, K.; MASCAGNA, D.; PALUMBO, A.; PROTA, G.; HEARING, V. J. The inherent cytotoxicity of melanin precursors: a revision. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1221, p. 272 - 278, 1994.

VALENT, G. V. Monitoring São Paulo state river in Brazil for mutagenic activity using the Ames test. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v. 8, p. 371 - 381, 1993.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by Ames test river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Res.**, v. 319, p. 31 - 45, 1993.

VITA-MARQUES, A. M.; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P; TAUK-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.;THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina.* **Quim. Nova***,* v. 31, n. 5, 2008. No prelo.

WAKAMATSU, K.; ITO, S. Advanced **c**hemical methods in melanin determination. **Pigment Cell Res.**, v. 15, p. 174 - 183, 2002.

WANG, J. M.; GONG, S. S.; OPPNHEIM, W. J. J. Chemokines, receptors, and their role in cardiovascular pathology. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 28, p. 83 - 90, 1998.

WANG, J.; MAZZA, G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-ç-activated RAW 264.7 macrophages. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 850 - 857, 2002.

WANG, Y.; CASADEVALL , A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to the melanin-binding compounds trifluoperazine and chloroquine. **Antimic. Ag. Chemoth.**, v. 40, p. 541 - 545, 1996.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 38, p. 2648 - 2650, 1994.

WATSON, R. R. ***In vitro* methods of toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 320 p.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 2 nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. 768 p.

WILLIANS, J. E. Review of antiviral and immunodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. **Altern. Med. Rev.**, v. 6, n. 6, p. 567 - 579, 2001.

WOLFRAM, L. J. The mechanism of hair bleaching. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 21, p. 875 - 900, 1970.

YOUNGCHIM, S.; MORRIS-JONES, R.; HAY, R. J.; HAMILTON, A. J. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 175 - 181, 2004.

ZHADANOVA, N. N.; BORISYUK, L. G.; ARTZATBANOV, V. Y. Ocurrence of the K type of life strategy in some melanin- containing fungi under experimental conditions. **Folia Microbiol.**, v. 35, p. 423 - 430, 1990.

ZUGHAIER, S. M.; RILEY, H. C.; JACKSON, S. K. A melanin pigment purified from an epidemic strain of *Burkholderia cepacia* attenuates monocyte respiratory burst activity by scavenging superoxide anion. **Infec. Immun.**, v. 67, n. 2, p. 908 - 913, 1998.

APÊNDICE

1. PREPARO DE MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E REAGENTES

1.1 Meio mínimo

Para cultivo do microorganismo foi utilizado o meio mínimo descrito por Cove (1966), que tem a seguinte composição:

Sulfato de magnésio heptaidratado.....0,52 g
Cloreto de potássio.....0,52 g
Fosfato de potássio monobásico.....1,52 g
Solução de elemento -traço.....1,0 mL
Água destilada até completar.....1000 mL

Após ajustar o pH em 6,8 o meio foi autoclavado a 1 atm de pressão por 20 minutos. As fontes de carbono e nitrogênio foram autoclavadas separadamente e posteriormente adicionada ao meio. Para a preparação de meio mínimo sólido foi adicionado 1,5 g de ágar por 100 mL de meio antes da autoclavagem.

A solução de elementos-traço é constituida dos seguintes sais:

Borato de sódio decaidratado.....0,040 g
Sulfato de cobre pentaidratado.....0,400 g
Sulfato de ferro heptaidratado.....0,532 g
Sulfato de manganês monoidratado .....0,292 g
Molibdato de sódio biidratado.....0,800 g
Sulfato de zinco heptaidratado.....8,000 g
Água destilada até completar.....1.000 mL

1.2 Avaliação da atividade citotóxica

- Meio de cultivo para células McCoy: constituído por meio Eagle (Instituto Adolfo Lutz) adicionado de 7,5% de soro fetal bovino (Cultilab).

- Tampão PBS (fosfato salino): solução A: 0,908 g de KH_2PO_4/100 mL; solução B: 0,9475 g de KH_2PO_4/100 mL. Misturar 28,5 ml de solução A para 71,5 mL de solução B. Acrescentar 0,85 g de NaCl. Ajustar pH = 7,2 – 7,4. Esterilizar em autoclave a 121ºC por 15 minutos.

- Solução de Vermelho Neutro: solução estoque do corante vermelho neutro (0,4% em tampão PBS) (Neutralrot Redox-Indikator – Riedel-de-Haën AG Seelze-Hannover – cod. 326.60) foi diluída a 50 µg/mL em meio Eagle sem soro. Após 24 horas de incubação, a 37ºC, a solução foi submetida à centrifugação (1500 rpm – 10 minutos), para remoção dos cristais remanescentes.

- Mistura de ácido acético/etanol (1:50): inicialmente, foi preparado álcool etílico 50%. Para a preparação de mistura, adicionou-se 1 mL de ácido acético glacial a 99 mL de ácool 50%.

- Substância teste: a solução da melanina extraída do fungo *A. nidulans* e a melanina sintética foram preparadas nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,2 µg/mL µg/mL, utilizando-se o meio de crescimento como diluente, a partir de uma solução-mãe na concentração de 10 mg/mL preparada em dimetilsulfóxido (DMSO).

1.3 Avaliação da morfologia das células McCoy

- Tampão de Sorensen (preparada na hora do uso e filtrada 3 vezes)
  Para diluir corantes de May-Grunwald e Giemsa.

Fosfato de sódio dibásico	6,77 g
Fosfato de potássio monobásico	2,59 g
Água destilada (qsp)	1000 mL

- Solução estoque de Giemsa (solução-mãe)

Giemsa em pó	6g
Metanol	500 mL
Glicerina neutra	500 mL

  Após a pesagem o pó foi colocado no graal, e adicionou-se a glicerina misturando bem com o pistilo. Transferiu-se a mistura depois de homogênea para um frasco âmbar. Foi medido o volume de metanol lavando o graal e em seguida foi transferido para o frasco âmbar, misturando bem. Deixou-se descansar por 1 semana.

- Solução estoque de May-Grunwald (solução-mãe)
  Foi preparada pela adição de 50 g do corante May-Grunwald em metanol, completando um volume de 1000 mL. Esta solução permaneceu em repouso durante 1 semana.

1.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

- Meio de crescimento: 1,0 g de glicose; 2,5 g de extrato de levedura; 5,0 g de triptona/L. Distribuir em tubos, e esterilizar em autoclave a 121ºC por 15 minutos.

- Substância teste: A solução de melanina foi preparada na concentração de 1,0 mg/mL em meio de crescimento, as quais foram, posteriormente, submetidas às diluições seriadas e seqüenciadas no mesmo meio em concentrações que variaram de 1000 a 31,2 µg/mL.

1.5 Avaliação da resposta imunológica

- Tampão PBS estoque: Solução A: 27,4 g de $NaHPO_4.2H_2O$/386 mL de água deionizada; Solução B: 7,875 g de $NaH_2PO_4.H_2O$/114 mL de água deionizada. Solução A e B foram misturadas, o pH ajustado a 7,2 com NaOH 4N e o volume completado para 1000 mL. A solução foi esterilizada em autoclave a 121ºC por 15 minutos e armazenada a 4ºC.

- Tampão PBS 0,01 M: Acrescentou-se 8,5 g de NaCl a 40 mL de tampão PBS estoque e o volume completado para 1000 mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado a 7,2, esterilizada em autoclave a 121ºC por 15 minutos e armazenada a 4ºC.

- Meio RPMI: Constituído por 10,3 g de RPMI–1640 (Sigma cód. R-7755)/1000 mL de água Milli-Q acrescido de 2,38 g de HEPES [Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1 (Sigma cód. H-0763)] e 2,0 g de bicarbonato de sódio. O pH foi ajustado a 7,2 com HCl 5 N, esterilizado em membrana Millipore 0,22

μm e acrescido de 5% soro fetal bovino inativado (Cultilab). No momento do uso, 100 U/mL de penicilina (Sigma cód. P-3414), 100 μg/mL de estreptomicina (Sigma cód. S-9137), 2 mM de glutamina (Sigma cód. G-5763) e 50 mM de mercaptoetanol (Merck cód. 805740) foram adicionados.

- Meio Tioglicolato (Difco cód. 0236-17) a 3%. Preparado em água deionizada, distribuído em tubos (4 mL/tubo), esterilizado a 121ºC por 15 minutos e armazenados no escuro a temperatura ambiente.

- Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* sorotipo O111:B4 (Sigma cód. L-2630): Preparado em solução estoque na concentração de 1000 μg/mL em RPMI e armazenado a – 20ºC. Concentração final utilizada nos testes 10 μg/mL em RPMI.

- Actinomicina D (Sigma cód. A-1410): Preparada em solução estoque na concentração de 10 mg/mL em água destilada estéril, aliquotada em *eppendorfs* (50 μL) e estocada a –20ºC. A concentração final utilizada no teste foi de 10 μg/mL em RPMI-1640.

- Solução de vermelho neutro: A solução estoque do corante vermelho neutro (0,4% em tampão PBS) (Neutralrot Redox-indikator - Riedel-De-Haën AG Seelze-Hannover - cód.326.60) foi preparada como descrito no item 8.1.

- Mistura ácido acético/etanol (1:50): Preparo descrito no item 1.2.

- Reagente de Griess: Constituído por 1,0 g de sulfanilamida, 0,1 g de naftiletilenodiamina, 2,5 g de ácido orto-fosfórico/ 100 mL de água Milli-Q e armazenado a 4ºC.

- Substância teste: A solução estoque de melanina foi inicialmente preparada em DMSO na concentração de 500 μg/mL, posteriormente diluída em RPMI e as concentrações finais utilizadas nos testes foram de 50, 100 e 200 μg/mL.

- Solução de vermelho neutro: A solução estoque do corante vermelho neutro (0,4% em tampão PBS) (Neutralrot Redox-indikator - Riedel-De-Haën AG Seelze-Hannover - cód.326.60) foi preparada como descrito no item 1.2.

1.6 Coloração do processo de fagocitose

Solução de Hanks

Cloreto de cálcio.....0,1855 g/L
Sulfato de magnésio pentaidratado.....0,204 g/L
Cloreto de potássio.....0,4 g/L
Fosfato de potássio monobásico .....0,06 g/L
Bicarbonato de sódio.....0,35 g/L
Cloreto de sódio.....8,000 g/L
Fosfato de sódio bibásico.....0,0475 g/L
Glicose .....1 g/L
Vermelho de fenol .....0,011 g/L
pH .....7,4 + 0,5
Osmolaridade .....280 mOm + 5%

1.7 determinação da atividade mutagênica *in vitro* do pigmento

- ágar mínimo glicosado: ágar mínimo glicosado com traços de histidina/biotina, constituído de ágar glicose (20 g de glicose, 15 g de ágar e 930 mL de água destilada) e meio Vogel Bonner E 50 x concentrado (10 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio de amônio, 500 g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada respectivamente, acrescido de 10 mL de uma solução de L-histidina 0,096 mg/mL (Sigma) e D-biotina 0,123 mg/mL (Sigma).

- Ágar de superfície (top agar): O agar de superfície foi composto de 0,5 g de cloreto de sódio, 0,6 g de Bacto-Agar e 100mL de água destilada, acrescido de 10mL de solução de L-histidina 0,096g/mL (Sigma) e D-biotina 0,123mg/mL (Sigma).

- Mistura S9: Foi utilizada a fração microssomal S9 de fígado de ratos induzidos com arocloror 1254 (MOLTOX, USA). À fração liofilizada foram acrescidas soluções de cloreto de magnésio 0,4M, cloreto de potássio 0,4 M, glicose-6-P 1M, beta-NADP 0,1M, tampão fosfato pH 7,0 0,2M e água destilada, todos mantidos em gelo durante o experimento.

2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.1 Avaliação da atividade citotóxica

Os valores do índice citotóxico (IC_{50}), que é a concentração do agente que reduz 50% da absorbância espectrofotométrica, foram obtidos por análise de regressão linear a partir das curvas de dose-resposta. Através de análise de regressão linear simples foi possível estabelecer uma função matemática que permite descrever e compreender a relação entre as duas variáveis em estudo (concentração de melanina x absorbância obtida nos testes), e a partir desta calcular os valores de IC_{50}.

As curvas dose-resposta com a regressão linear de 4 experimentos realizados em triplicata para a melanina sintética e para a melanina extraída do fungo *A. nidulans* sobre células McCoy, sem e após metabolização, são mostradas nas figuras 49, 50, 51 e 52, respectivamente.

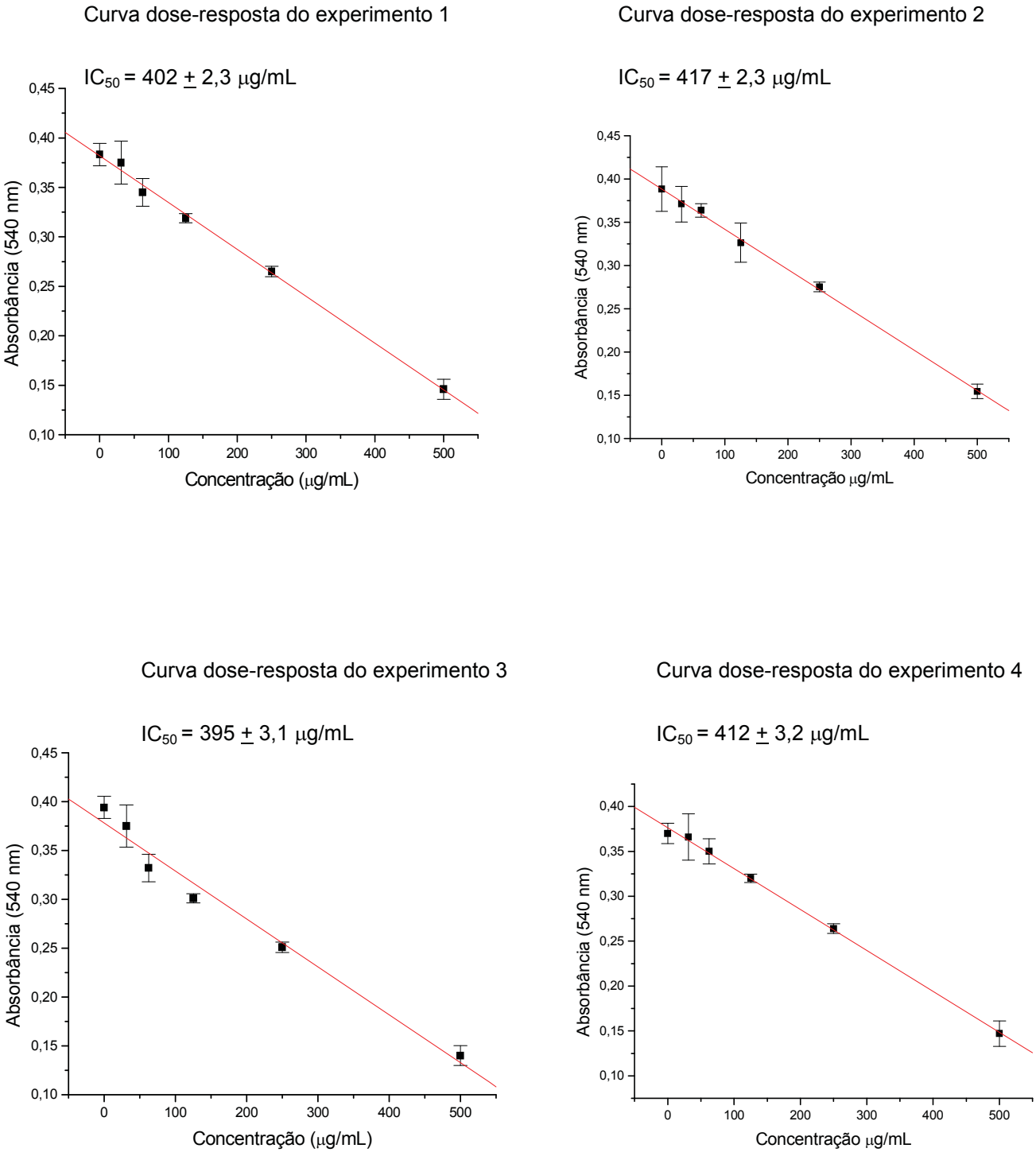


Figura 49 - Curvas dose-resposta representativas e os respectivos valores médios de IC_{50} de 4 experimentos realizados separadamente em triplicata nas mesmas condições para a melanina sintética.

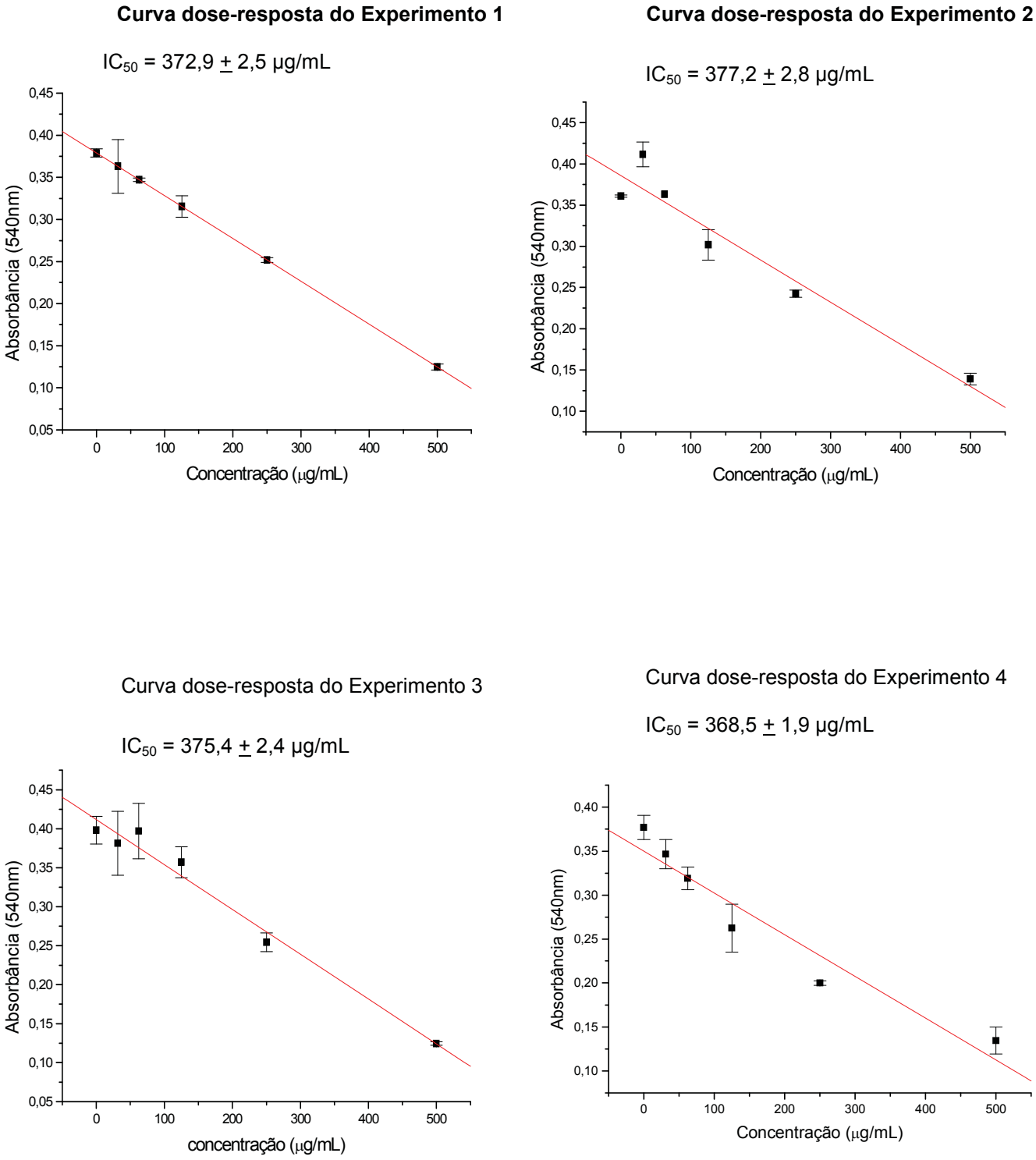


Figura 50 - Curvas dose-resposta representativas e os respectivos valores médios de IC_{50} de 4 experimentos realizados separadamente em triplicata nas mesmas condições para a melanina extraída do fungo *A. nidulans.*

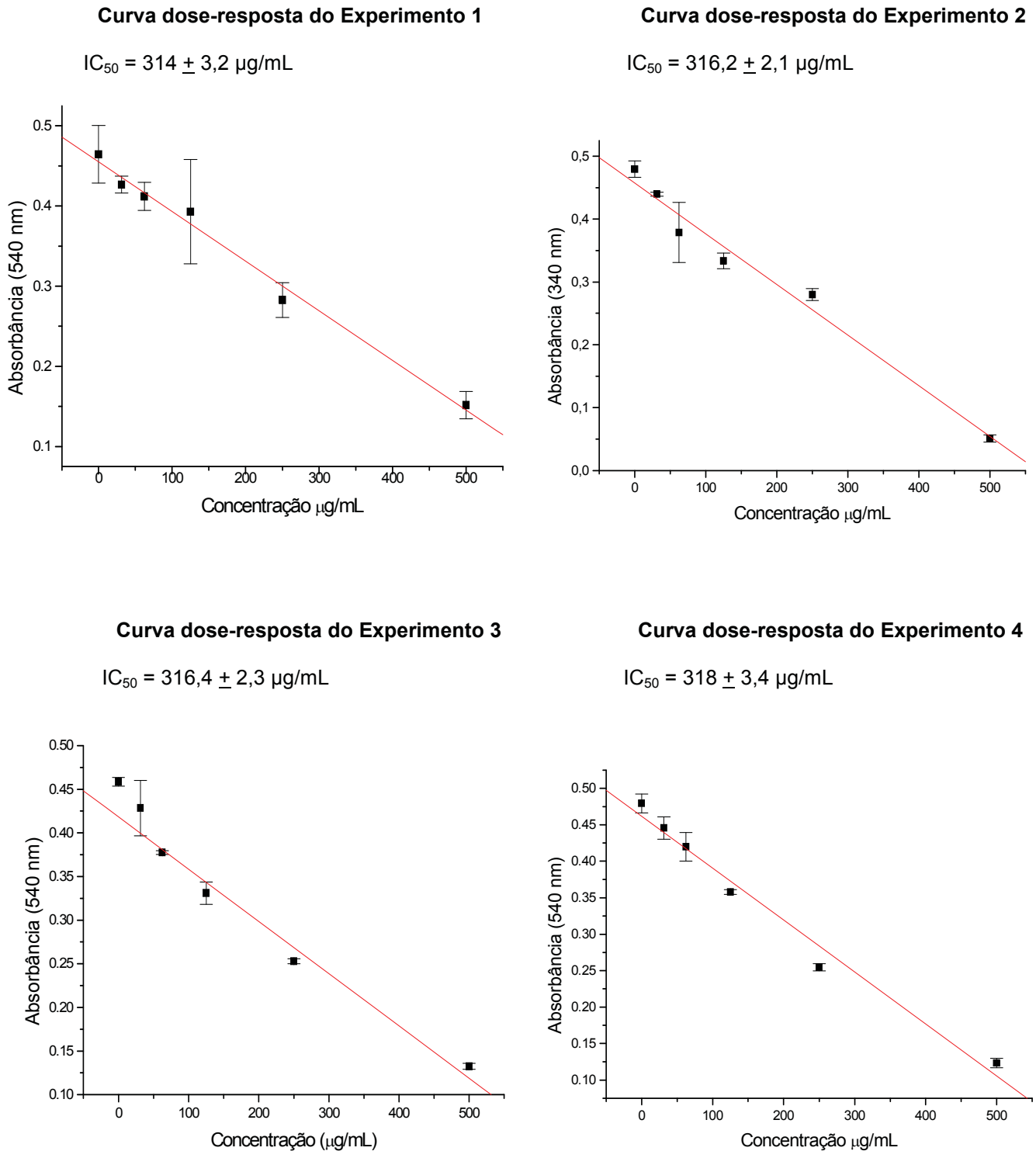
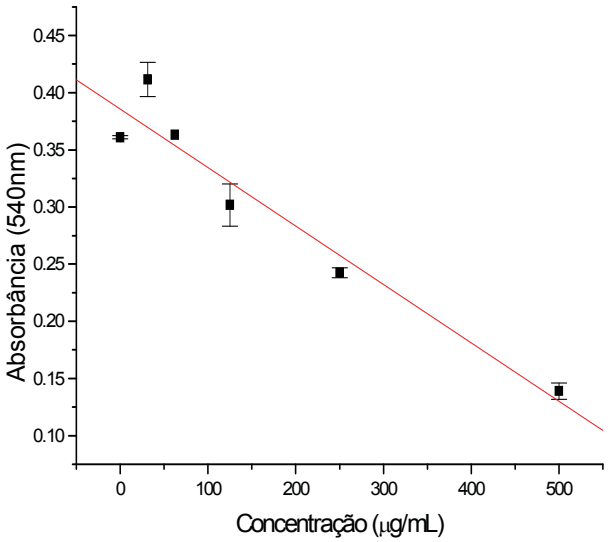


Figura 51 - Curvas dose-resposta representativas e os respectivos valores médios de IC_{50} de 4 experimentos realizados separadamente em triplicata com a melanina sintética, na presença do sistema de ativação metabólica (fração S9).

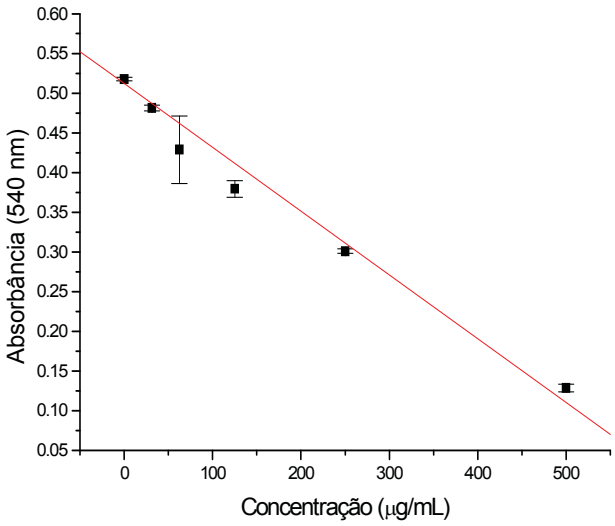
Curva dose-resposta do Experimento 1

IC_{50} = 408,1 ± 2,3 µg/mL



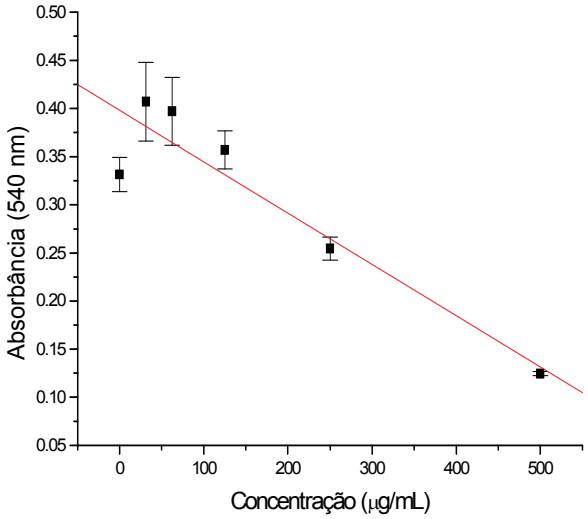
Curva dose-resposta do Experimento 2

IC_{50} = 415,2 ± 3,8 µg/mL



Curva dose-resposta do Experimento 3

IC_{50} = 412,2 ± 3,3 µg/mL



Curva dose-resposta do Experimento 3

IC_{50} = 417 ± 3,1 µg/mL

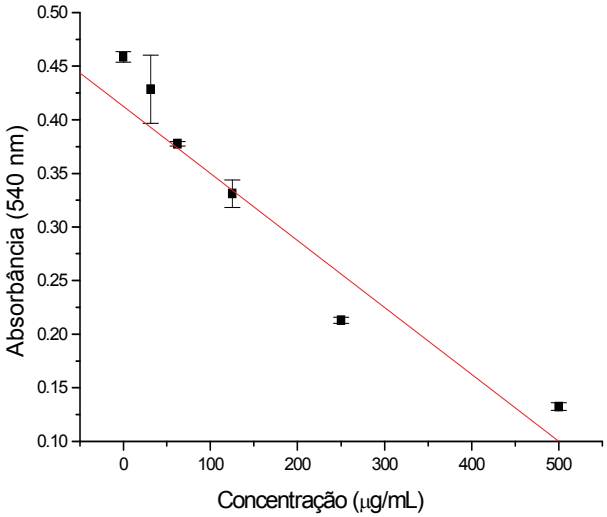


Figura 52 - Curvas dose-resposta representativas e os respectivos valores médios de IC_{50} de 4 experimentos realizados separadamente em triplicata com a melanina extraída do fungo *A. nidulans*, na presença do sistema de ativação metabólica (fração S9).

2.2 Atividade antimicrobiana

Tabela 9 – Resultado do crescimento de diferentes linhagens bacterianas na presença de diferentes concentrações de melanina extraída do fungo *A. nidulans*. Resultados apresentados como média da absorbância + desvio padrão.

Concentração Melanina (µg/mL)	**Absorbância do crescimento bacteriano (620 nm)**		
	S. aureus	***E. faecalis***	***E. coli***
0	0,567 ± 0,03	0,279 ± 0,01	0,394 ± 0,01
0,49	0,486 ± 0,02	0,197± 0,008	0,381 ± 0,01
0,98	0,479 ± 0,03	0,194 ± 0,009	0,392 ± 0,015
1,98	0,434 ± 0,01	0,190 ± 0,01	0,392 ± 0,02
3,9	0,349 ± 0,01	0,182 ± 0,012	0,389 ± 0,015
7,8	0,296 ± 0,025	0,180 ± 0,015	0,383 ± 0,02
15,6	0,287 ± 0,015	0,177 ± 0,018	0,383 ± 0,03
31,25	0,285 ± 0,01	0,168 ± 0,015	0,366 ± 0,01
62,5	0,249 ± 0,01	0,165 ± 0,014	0,363 ± 0,011
125	0,232 ± 0,03	0,157 ± 0,01	0,348 ± 0,012
250	0,195 ± 0,01	0,158 ± 0,01	0,298 ± 0,01
500	0,189 ± 0,01	0,132 ± 0,011	0,164 ± 0,018
1000	0,102 ± 0,01	0,049± 0,01	0,085 ± 0,01

2.3 Atividade antioxidante

Os ensaios antioxidantes e imunológicos realizados com a melanina extraída do fungo A. *nidulans* e com a melanina sintética foram submetidos à análise estatística para garantir a confiabilidade dos resultados.

A análise estatística foi realizada por análise de variância, denominada como ANOVA, que é um procedimento estatístico para testes de hipóteses na comparação das médias de duas ou mais populações. Através desta técnica é possível obter e comparar o *valor-P* em um nível de significância de 0,05%, e afirmar se ocorre diferenças estatísticas entre os resultados. Os valores encontrados em cada análise para os diferentes testes estão apresentados nas tabelas abaixo.

Tabela 10 – Percentual de inibição do radical livre DPPH na presença de diferentes concentrações de trolox (controle), melanina sintética e de pigmento extraído do fungo *A. nidulans*. Resultados apresentados como média da porcentagem de inibição ± desvio padrão e o valor-P obtido por análise de variância (ANOVA).

Concentração (µg/mL)	***Trolox***	***Melanina sintética***	***Melanina de A. nidulans***	***Valor-P***
6,25	84,79 ± 0,01	48,01 ± 2,03	43,33 ± 0,57	2,18E-08* (0,017797)§
12,5	87,3 ± 0,26	80,02 ± 1,05	62,11 ± 0,43	9,23E-09* (6.31E-06)§
25	97,9 ± 0,08	97,05 ± 0,82	85,03 ± 1,09	0,000105* (0,003602)§
50	100 ± 0	100 ± 0	91,04 ± 1,73	4,56E-05* (0,000844)§
100	100 ± 0	100 ± 0	93,67 ± 1,53	0,000166* (0.001991)§
200	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	

*p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e as melaninas.

§ p<0,05 resultados estatisticamente diferentes, analisados para melanina sintética e melanina de *A. nidulans.*

Tabela 11 – Percentual de inibição da ação do radical hidroxil $OH^{\bullet}$) sobre a pentose na presença de diferentes concentrações de trolox (controle), melanina sintética e de pigmento extraído do fungo *A. nidulans.* Resultados apresentados como média da porcentagem de inibição ± desvio padrão e o valor-P obtido por análise de variância (ANOVA).

Concentração (µg/mL)	***Trolox***	***Melanina sintética***	***Melanina de A. nidulans***	***Valor-P***
25	95,21 ± 0,50	10,29 ± 1,09	9,53 ± 0,25	8,77E-12* (0.304413)
50	95,75 ± 0,54	24,42 ± 0,87	18,47 ± 1,06	5,99E-11* (0.001678)§
75	96,58 ± 0,32	40,41± 0,79	44,27 ± 1,46	1,36E-09* (0.021484)§
100	97,81 ± 0,14	57,52 ± 1,07	59,3 ± 0,75	1,37E-09* (0.077709)
150	97,90 ± 0,12	85,87 ± 2,18	86,57 ± 4,8	0.0003572* (0.829387)
200	98,11 ± 0,11	90,45 ± 1,16	87,93 ± 2,96	0.000596* (0.454156)

*****p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e as melaninas.

§ p<0,05 resultados estatisticamente diferentes, analisados para melanina sintética e melanina de *A. nidulans.*

Tabela 12 – Percentual de inibição do peróxido de hidrogênio na presença de diferentes concentrações de trolox (controle), melanina sintética e de pigmento extraído do fungo *A. nidulans.* Resultados apresentados como média da porcentagem de inibição ± desvio padrão e o valor-P obtido por análise de variância (ANOVA).

Concentração (µg/mL)	***Trolox***	***Melanina sintética***	***Melanina de A. nidulans***	***Valor-P***
25	65,68 ± 0,5	10,29 ± 1,09	11,44 ± 1,09	5.61E-10* (0.06553273)§
50	87,9 ± 0,54	24,42 ± 0,87	21,33 ± 1,45	4.11E-10* (0.03401858)
75	100 ± 0	40,41± 0,79	34,1 ± 1,32	2.12E-10* (0.00207355)
100	100 ± 0	57,52 ± 1,07	56,5 ± 0,96	1.39E-09* (0.286436)§
150	100 ± 0	85,87 ± 2,18	71,03 ± 2,17	2.16E-06* (0.052692)§
200	100 ± 0	88,45 ± 1,16	81,87 ± 0,74	4.11E-07*(0.00116)

*****p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e as melaninas.

§ p<0,05 resultados estatisticamente diferentes, analisados para melanina sintética e melanina de *A. nidulans.*

Tabela 13 – Percentual de inibição do efeito quelante na presença de diferentes concentrações de EDTA (controle), melanina sintética e de pigmento extraído do fungo *A. nidulans.* Resultados apresentados como média da porcentagem de inibição + desvio padrão e o valor-P obtido por análise de variância (ANOVA).

Concentração (µg/mL)	***EDTA***	***Melanina sintética***	***Melanina de A. nidulans***	***Valor-P***
25	51,95 ± 1,44	52,83 ± 1,45	58,6 ± 1,25	0,00209* (0,497197)
50	69,76 ± 1,59	74,83 ± 1,98	75,57 ± 1,78	0,0143* (0,655383)
75	72,3 ± 1,85	86,3± 1,85	86,48 ± 1,95	0,000137* (0,930151)
100	81,4 ± 1,76	89,8 ± 2,12	90,77 ± 1,98	0,002014* (0,593522)
150	88,75 ± 2,01	90,5 ± 2,25	91,21 ± 2,05	0,396275 (0,706871)
200	91,4 ± 2,05	91,16 ± 2,01	93,96 ± 2,14	0,26163 (0,173908)

*p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e as melaninas.

§ p<0,05 resultados estatisticamente diferentes, analisados para melanina sintética e melanina de *A. nidulans.*

Tabela 14 – Percentual de inibição do ânion superóxido na presença de diferentes concentrações de trolox (controle), melanina sintética e de pigmento extraído do fungo *A, nidulans,* Resultados apresentados como média da porcentagem de inibição ± desvio padrão e o valor-P obtido por análise de variância (ANOVA).

Concentração (µg/mL)	***Trolox***	***Melanina sintética***	***Melanina de A. nidulans***	***Valor-P***
50	62,46 ± 1,78	50,91 ± 2,12	42,44 ± 2,36	7,33E-05* (0,009848) §
100	69,97 ± 1,95	58,61 ± 2,12	60,53 ± 2,048	0,000502* (0,009848) §
150	80,36 ± 1,025	63,04 ± 2,25	62,07 ± 2,075	8,91E-06* (0,522307)
200	88,91 ± 2,69	78,78 ± 2,01	84,94 ± 3,02	0,002706* (0,030733) §

*p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e as melaninas.

§ p<0,05 resultados estatisticamente diferentes, analisados para melanina sintética e melanina de *A. nidulans.*

Tabela 15 – Valores de absorbância demonstrando o efeito da melanina extraída do fungo *A. nidulans* sobre a formação de ácido úrico, comparado com o controle (formação de ácido úrico na ausência de melanina). Resultados apresentados como média ± desvio padrão e o valor-P obtido por análise de variância (ANOVA).

Melanina de A. nidulans (µg/mL)	***Absorbância (293 nm)***	***Valor-P***
Controle	0,0902 ± 1,5E-4	-
50	0,09 ± 1,5E-4	0,422893
100	0,09 ± 2E-4	0,786527
150	0,089 ± 1E-4	0,052178
200	0,089 ± 1,4E-4	0,05397

*p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e a melanina de *A. nidulans*.

Tabela 16 – Valores de absorbância demonstrando o efeito da sintética sobre a formação de ácido úrico, comparado com o controle (formação de ácido úrico na ausência de melanina). Resultados apresentados como média ± desvio padrão e o valor-P obtido por análise de variância (ANOVA).

Melanina sintética (µg/mL)	***Absorbância (293 nm)***	***Valor-P***
Controle	0,0902 ± 1,5E-4	-
50	0,092 ± 1,5E-4	0,04125*
100	0,09 ± 2E-4	0,7994
150	0,088 ± 1,3E-4	0,05384
200	0,09 ± 1,4E-4	0,08458

*p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e a melanina de *A. nidulans*.

Tabela 17 – Produção de NO por macrófagos peritoneais tratados com melanina extraída do fungo *A. nidulans* e o valor-P obtido através de análise de variância (ANOVA) comparando-se a quantidade de NO induzido por diferentes concentrações de melanina com o determinado para o controle (macrófagos não estimulados).

Melanina de A, nidulans (µg/mL)	***NO/NO_2^- (µmol/L)***	***Valor-P***
Controle	0,67718 ± 0,254	-
25	0 ± 0,0014	0,009898*
50	0,0019 ± 0,0009	0,009963*
100	0,1012 ± 0,0013	0,017138*
LPS	46,70639 ± 2,356	4,66E-06*

*p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e a melanina de *A. nidulans*.

Tabela 18 – Valores de inibição da liberação de NO por macrófagos peritoneais tratados com diferentes concentrações de melanina extraída do fungo *A. nidulans* após estimulação por LPS e valor-P obtido através de análise de variância (ANOVA).

Melanina de A. nidulans (µg/mL)	***TNF-α (U/mL)***	***Valor-P***
Controle	1.269	6.82E-06*
25	55.2828	0.001652*
50	48.66989	0.000746*
100	13.13763	1.67E-05*
LPS	74.15376	-

*p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e a melanina de *A. nidulans*.

Tabela 19 – Produção de TNF-α por macrófagos peritoneais tratados com melanina extraída do fungo *A. nidulans* e o valor-P obtido através de análise de variância (ANOVA) comparando-se a quantidade de TNF-α induzido por diferentes concentrações de melanina com o determinado para o controle (macrófagos não estimulados).

Melanina de A. nidulans (µg/mL)	***TNF-α (U/mL)***	***Valor-P***
Controle	17.56659 ± 2,3415	-
25	25.054 ± 8,2354	0.204419
50	33.6933 ± 5,627	0.01016*
100	38.87689 ± 6,254	0.004618*
LPS	322.2462 ± 8,1325	3.96E-07*

*p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e a melanina de *A. nidulans*.

Tabela 20 – Valores de inibição da liberação de TNF-α por macrófagos peritoneais tratados com diferentes concentrações de melanina extraída do fungo *A. nidulans* após estimulação por LPS e valor-P obtido através de análise de variância (ANOVA).

Melanina de A. nidulans (µg/mL)	***TNF-α (U/mL)***	***Valor-P***
Controle	5.14626 ± 1.00551	1.22E-07*
25	313.5347 ± 3.01097	0.00149*
50	299.5358 ± 5.01153	0.000638*
100	167.3693 ± 4.00751	2.67E-06*
LPS	347.7086 ± 7.01401	-

*p<0,05 resultados estatisticamente diferentes comparando o controle e a melanina de *A. nidulans*.