

WILLIAM BARTOLOMEU DE MEDEIROS

**“Estudo do efeito de indutores na melanização do mutante MEL1 do fungo  
*Aspergillus nidulans.*”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado

Co-orientador: Profa. Dra. Kelly Johana Dussán Medina

ARARAQUARA – SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

M488e Medeiros, William Bartolomeu de  
Estudo do efeito de indutores na melanização do  
mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* / William  
Bartolomeu de Medeiros. – Araraquara : [s.n.], 2020  
70 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado  
Coorientador: Kelly Johana Dussán Medina

1. *Aspergillus nidulans*. 2. Melanina. 3. Fungos. 4. Fenol  
oxidase. 5. Planejamento experimental. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estudo do efeito de indutores na melanização do mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans*"

**AUTOR: WILLIAM BARTOLOMEU DE MEDEIROS**

**ORIENTADORA: SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO**

**COORIENTADORA: KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 28 de fevereiro de 2020

## DADOS CURRICULARES

**Nome:** William Bartolomeu de Medeiros

**Nome em citações bibliográficas:** MEDEIROS, W. B.

**Nacionalidade:** Brasileiro

**Sexo:** Masculino

**Nascimento:** 17/09/1987 – São Paulo – SP

**Endereço profissional:** Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química, Dpto. de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Francisco Degni nº 55 Quintandinha – Araraquara

14800-900, SP – Brasil

**Endereço eletrônico:** medeiros.w17@gmail.com

## FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

**2018 – atual** Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP,

Título: Estudo do efeito de indutores na melanização do mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans*.

Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado.

Co-orientador: Kelly Johana Dussán Medina

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

**2011 – 2017** Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade

Universidade Federal da Integração Latino-Americana – UNILA

Título: Potencial de fungos filamentosos no tratamento da toxicidade do extrato de fumo – *Nicotiana tabacum*.

Orientador: Michell Rodrigues Zambrano Passarini

Co-orientador: Rafaella Costa Bonugli-Santos

## **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

### **2019 – 2019** Minicurso

Planejamento e otimização de processos industriais, com carga horária de 8 horas.

### **2018 – 2018** ICTP – SAIFR

*Entrepreneurship School for Scientist and Engineers*, com carga horária de 40 horas.

### **2018 – 2018** Minicurso de Biologia Molecular

*Molecular biology tools to understand the microbial processes involved in the production of bioenergy using wastes and wastewaters*, com carga horaria de 24 horas.

### **2013 – 2014** Mobilidade acadêmica

*Arizona State University*, EUA (18 meses).

### **2013 – 2013** Curso de atualização em energias do Biogás - EAD

Curso de atualização em Energias do Biogás na modalidade à distância, com carga horária de 90 horas, voltado à atuação de profissionais nas questões energéticas do biogás

## **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

1. VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – Microbiologia Interligada: Efeito da granulometria da biomassa no processo de extração da melanina em fungos. (2019).

2. II Semana acadêmica de Ciências Biológicas – Da ciência básica à aplicada. Minicurso ministrado: Práticas Microbiológicas: demandas e metodologias. Com carga horária de 8 horas. (2017).
3. *23<sup>rd</sup> Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology and 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology: Strategy to obtaining microbial resources from seaweed to lacase biotechnological applications* (2015).

### **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS**

1. 1º Workshop de Empreendedorismo – 2018
2. Oficina sobre o cadastro no SISGEN – 2018
3. VIII Simpósio de Microbiologia Aplicada – UNESP Rio Claro – 2017
4. VIII Congresso Brasileiro de Micologia – 2016

### **ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS**

1. Membro da comissão organizadora do *Pint of Science* 2019 – Araraquara, SP.
2. II Semana acadêmica de Ciências Biológicas – Da ciência básica à aplicada. UNILA – 2017
3. I Jornada de Biologia da UNILA – Sustentabilidade: O papel da Biologia em um contexto interdisciplinar – 2012.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço minha mãe Margareth Bartolomeu Sanchez, por todo seu esforço para possibilitar uma vida melhor para mim e meus irmãos. Com a senhora aprendi o significado de coragem, persistência e determinação. Obrigado mãe!

Agradeço aos meus irmãos Weberth Medeiros e Jéssika Medeiros, por sempre acreditarem em minha capacidade e torcerem para que eu alcance meus objetivos como se fossem os deles. Obrigado por todo apoio e encorajamento!

Agradeço a minha orientadora Sandra Regina Pombeiro Sponchiado por sua dedicação e maestria ao longo dessa relação orientador-orientando. Levarei seus ensinamentos para a vida. Acima de tudo, obrigado pela paciência e amizade.

Agradeço a professora Kelly Medina pela co-orientação e pela atenção em sanar incontáveis dúvidas sobre as análises estatísticas.

Ao professor Paulo Cerri por toda gentileza em abrir seu laboratório e compartilhar seu conhecimento lado a lado na bancada.

*Agradezco a Cristian Tugues por su compañía a lo largo de estos meses. El roommate mas buena onda que tuve el placer de conocer.*

Aos companheiros de laboratório Fátima, Beatriz e Karen pela troca de conhecimento e por tornarem a rotina no laboratório mais leve e agradável. Aos amigos do departamento, Samir e Maria. Ao parceiro Rodrigo Duarte, um mestre cervejeiro, um conhecedor das artes obscuras da Biologia Molecular e, acima de tudo, um grande amigo. Obrigado por todo ensinamento e amizade ao longo dessa jornada.

Agradeço a Tamires por ouvir minhas incansáveis reclamações sobre a vida. Ao Marcos pelas brassagens, boas conversas e risadas.

A Cervejaria av.42 e toda sua equipe por se tornarem parte importante da minha breve passagem por Araraquara. Obrigado por todo aprendizado, amizade e, principalmente, pelas cervejas de VERDADE!

A Alexandra Elbakyan, fundadora da plataforma Sci-Hub, meus agradecimentos especiais por lutar pelo livre acesso universal ao conhecimento científico.

Aos amigos de longa data, que mesmo distante se fazem presente, seja para comemorar junto uma conquista ou dar apoio nos momentos difíceis. Ao Rafael, Camila, Melissa, Lara, Marina e Samantha, obrigado por toda amizade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.  
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”.*

*(Paulo Freire)*

## RESUMO

A melanina é um pigmento presente em todos os reinos, formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos por ação de polifenoloxidasas, principalmente tirosinase e lacase. Em fungos, a melanina está depositada na parede celular e confere ao fungo proteção a condições ambientais adversas. Devido as suas propriedades físico-químicas e o seu amplo espectro de atividades biológicas, a melanina apresenta potencial para ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas nas áreas da medicina, ambiental, farmacocsmética e nanotecnologia. Nosso grupo de pesquisa tem estudado uma linhagem mutante do fungo *Aspergillus nidulans*, denominada MEL1, que apresenta produção aumentada de melanina. A melanina produzida pelo MEL1 apresentou atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, não exibindo efeito citotóxico ou mutagênico, evidenciando seu potencial como componente em formulações cosméticas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer condições ótimas para a produção do pigmento, estudando o efeito de L-tirosina, L-DOPA, glicose, ácido glutâmico e sulfato de cobre na melanização do MEL1 por meio de planejamento experimental e também correlacionar a atividade de tirosinase e lacase com a melanização do MEL1. Com os resultados obtidos no planejamento experimental foi possível estabelecer as condições ótimas da cultura (meio mínimo suplementado com inositol 20 mg.L<sup>-1</sup>; nitrato de sódio 70 mmol.L<sup>-1</sup>; Tween 80 0,2% (v/v), glicose 1,8% (v/v), ácido glutâmico 10,65 mmol.L<sup>-1</sup>; sulfato de cobre 0,27 µmol.L<sup>-1</sup>; L-tirosina 0,2 mmol.L<sup>-1</sup> e L-DOPA 6,85 mmol.L<sup>-1</sup>), as quais que resultou em um aumento de 640% na produção de melanina pelo MEL1 em comparação a condição controle (antes da otimização). Os resultados também mostraram que o L-DOPA exerceu um grande efeito na melanização do MEL1, podendo ser considerado como substrato preferencial para produção de melanina e, além disso, a tirosinase mostrou ser a enzima responsável pela biossíntese do pigmento. Portanto, o presente estudo maximizou a produção da melanina pelo mutante MEL1 do fungo *A. nidulans*, bem como, contribuiu para o avanço da compreensão de seu metabolismo.

**Palavras-chave:** *Aspergillus nidulans*. Melanina. Fungos. Fenol oxidase. Planejamento experimental.

## ABSTRACT

Melanin is a pigment present in all kingdoms, formed by the oxidative polymerization of phenolic or indole compounds by the action of polyphenoloxidases, mainly tyrosinase and laccase. In fungi, melanin is deposited on the cell wall, and it gives the fungus protection from adverse environmental conditions. Due to its physico-chemical properties and its broad spectrum of biological activities, melanin has the potential to be used in several biotechnological applications in the fields of medicine, environment, pharmaceuticals, and nanotechnology. Our research group has studied a mutant strain of the fungus *Aspergillus nidulans*, named MEL1, which exhibited increased melanin production. The melanin produced by MEL1 showed antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities, without any cytotoxic or mutagenic effect, highlighting its potential as a component in cosmetic formulations. In this context, this work aimed to establish optimal conditions for pigment production, studying the effect of L-tyrosine, L-DOPA, glucose, glutamic acid and copper sulfate on melanization of MEL1 by experimental design strategy and also to correlate tyrosinase and laccase activity with MEL1 melanization. With the results obtained in the experimental design it was possible to establish the optimal conditions of the culture (minimum medium supplemented with inositol 20 mg.L<sup>-1</sup>; sodium nitrate 70 mmol.L<sup>-1</sup>; Tween 80 0.2% (v / v) , glucose 1.8% (v / v), glutamic acid 10.65 mmol.L<sup>-1</sup>; copper sulfate 0.27 μmol.L<sup>-1</sup>; L-tyrosine 0.2 mmol.L<sup>-1</sup> and L-DOPA 6.85 mmol.L<sup>-1</sup>) which resulted in a 640% increase in melanin production by MEL1 compared to the control condition (before optimization). The results also showed that L-DOPA had a great effect on the melanization of MEL1, which can be considered the preferred substrate for melanin production and tyrosinase was shown to be the enzyme responsible for pigment biosynthesis. Therefore, the present study maximized the melanin production by the mutant strain MEL1 but also contributed to improving the understanding of its metabolism.

**Keywords:** *Aspergillus nidulans*. Melanin. Fungi. Phenol oxidase. Experimental design.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Micrografia de uma hifa de <i>Amorphotheca resinæ</i>	<b>18</b>
<b>Figura 2 -</b>	Estruturas químicas dos precursores da melanina.	<b>21</b>
<b>Figura 3 -</b>	Representação esquemática da biossíntese de DHN-melanina em fungos.	<b>22</b>
<b>Figura 4 -</b>	Representação esquemática da biossíntese da DOPA-Melanina em fungos.	<b>23</b>
<b>Figura 5 -</b>	Geometria do sítio de ligação binuclear de cobre da tirosinase em <i>Agaricus bisporus</i> .	<b>24</b>
<b>Figura 6 -</b>	Vias de oxidação catalisada por tirosinase.	<b>25</b>
<b>Figura 7 -</b>	Estados de oxidação dos átomos de cobre no sítio ativo da tirosinase.	<b>26</b>
<b>Figura 8 -</b>	Centros de cobre da lacase.	<b>27</b>
<b>Figura 9 -</b>	Atividade de lacase e estruturas de polifenóis.	<b>28</b>
<b>Figura 10 -</b>	Crescimento das linhagens selvagem e mutantes do fungo <i>A. nidulans</i> .	<b>31</b>
<b>Figura 11 -</b>	Mutante MEL1 do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> crescido em meio mínimo por cinco dias a 37°C.	<b>34</b>
<b>Figura 12 -</b>	Metodologia de cultivo do mutante MEL1.	<b>36</b>
<b>Figura 13 -</b>	Curva analítica DOPA-melanina sintética.	<b>38</b>
<b>Figura 14 -</b>	Coloração da biomassa em função da produção de melanina em diferentes ensaios do DCCR.	<b>48</b>
<b>Figura 15 -</b>	Melanização do MEL1 em função da variação da concentração de L-DOPA no meio de cultivo.	<b>50</b>

<b>Figura 16 -</b>	Superfícies de respostas para a produção de melanina.	<b>52</b>
<b>Figura 17 -</b>	Função de desejabilidade.	<b>55</b>
<b>Figura 18 -</b>	Melanização da biomassa do MEL1 nas condições controle (a) e otimizada (b).	<b>57</b>
<b>Figura 19 -</b>	Crescimento, produção de melanina e atividade enzimática do MEL1.	<b>58</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Níveis de cada fator (variável independente) estudado para a resposta produção de melanina ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) pelo mutante MEL1.	<b>39</b>
<b>Tabela 2</b> - Matriz dos ensaios do DCCR para resposta produção de melanina ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) pelo mutante MEL1.	<b>40</b>
<b>Tabela 3</b> - Produção de biomassa, pigmento e melanina em resposta a diferentes condições de cultivo.	<b>44</b>
<b>Tabela 4</b> - Matriz de ensaios do DCCR $2^5$ .	<b>46</b>
<b>Tabela 5</b> - Efeito dos fatores na produção de melanina ( $\text{mg.g}^{-1}$ ).	<b>49</b>
<b>Tabela 6</b> - Análise de variância para regressão dos fatores.	<b>51</b>
<b>Tabela 7</b> - Produção de melanina pelo MEL1 na condição otimizada para validação do modelo proposto.	<b>56</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Melanina e suas aplicações biotecnológicas</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Síntese de melanina em fungos</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Mecanismo de ação da tirosinase e lacase</b>	<b>23</b>
2.3.1	Tirosinase	23
2.3.2	Lacase	27
<b>2.4</b>	<b>Efeito de indutores na melanização em fungos</b>	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>Linhagem melanizada do fungo <i>Aspergillus nidulans</i></b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Mutante MEL1</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Meio de cultivo</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Suspensão de esporos</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Cultivo do fungo</b>	<b>35</b>
<b>4.5</b>	<b>Extração e quantificação de melanina</b>	<b>37</b>
<b>4.6</b>	<b>Efeito do ácido glutâmico na produção de melanina pelo mutante MEL1</b>	<b>38</b>
<b>4.7</b>	<b>Planejamento experimental</b>	<b>39</b>

<b>4.8</b>	<b>Avaliação das enzimas tirosinase e lacase</b>	<b>41</b>
4.8.1	Preparação de extrato enzimático livre de células	42
4.8.2	Atividade de tirosinase	42
4.8.3	Atividade de lacase	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Efeito do ácido glutâmico na produção de melanina pelo mutante MEL1</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Planejamento experimental – DCCR</b>	<b>46</b>
<b>5.3</b>	<b>Validação do modelo</b>	<b>55</b>
<b>5.4</b>	<b>Atividade enzimática de lacase e tirosinase pelo MEL1</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos são utilizados para a produção de uma grande diversidade de compostos que apresentam interesse comercial, tais como ácidos orgânicos, enzimas, antibióticos e pigmentos naturais (RAO et al., 2017). Este último aparece como uma alternativa para substituição dos corantes sintéticos, uma vez que os pigmentos naturais são moléculas biodegradáveis e consideradas seguras para saúde humana em contraste com as propriedades mutagênicas e cancerígenas de alguns pigmentos sintéticos (ARULDASS et al., 2018; DUFOSSE, 2017; LV et al., 2017; NERI-NUMA et al., 2017; VENKATACHALAM et al., 2018). Além disso, mais recentemente as indústrias farmacêuticas têm demonstrado grande interesse nos pigmentos naturais devido as suas possíveis atividades biológicas, tais como antitumoral, anti-inflamatório e neuroprotetora, criando assim novas demandas e aplicações para essas moléculas (NERI-NUMA et al., 2017). Os fungos filamentosos destacam-se por produzirem uma extraordinária gama de pigmentos que incluem várias classes químicas, como carotenóides, azafilonas, antraquinonas, flavinas, fenazinas, quinonas e melaninas (DUFOSSE, 2017; LV et al., 2017).

Melanina é um pigmento escuro (variando da cor marrom ao preto), formado a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos, que pode ser encontrado em uma variedade de organismos, desde plantas e bactérias até fungos e animais. Este pigmento é conhecido como protetor a diversos estressores ambientais, tais como raios UV ou radiação ionizante, oxidantes (HClO ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e metais (GEIB et al., 2016; KUNWAR et al., 2012; YOUNGCHIM et al., 2004). Em função das propriedades físico-químicas da melanina e suas várias atividades biológicas descritas, têm crescido as aplicações biotecnológicas utilizando esse pigmento nas mais diversas áreas, tais como ambiental, médica, farmacoscética e nanotecnologia (FERNANDEZ; KOIDE, 2013; POMBEIRO-SPONCHIADO et al., 2017).

Na área ambiental, estudos demonstraram o potencial da aplicação de fungos melanizados para a remoção de radionuclídeos e metais pesados de soluções aquosas, fornecendo um meio alternativo para tratamento de efluentes industriais (SHAKYA et al., 2015). Outro estudo demonstrou a importância da associação simbiótica do fungo *Cenococcum geophilum* (um ectomicorriza melanizado) com plantas para a tolerância à dessecação de cultivos de interesse comercial, podendo

ser uma nova estratégia de estudo para plantios em ambientes com pouca disponibilidade de água (FERNANDEZ; KOIDE, 2013). Em relação a área médica, Zhang et al. (2015) demonstraram que nanopartículas de melanina podem entrar com sucesso em tumores e atuar como um eficiente sistema de administração de medicamentos para tratamentos de tumores, aumentando assim a utilização segura dos medicamentos para o tratamento e diminuindo significativamente a dosagem utilizada e seus efeitos colaterais. A melanina também pode ser usada em nanotecnologia como um biomaterial semiconductor biodegradável, como demonstrado em estudo realizado por Bettinger et al. (2009).

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

De acordo com a literatura, ainda não há um método economicamente viável para a produção natural de melanina, visando atender a sua possível demanda em aplicações biotecnológicas. Sun et al. (2016) argumentam que a produtividade de um bioprocessamento depende das condições de cultivo, as quais afetam não somente o crescimento celular como também a produção de metabólitos de interesse. Neste sentido, vários fatores, como tipo e concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura, velocidade de agitação, influenciam a produção de pigmentos porque promovem alterações metabólicas durante o crescimento do fungo. Com essa premissa, nosso grupo de pesquisa estudou a influência das condições de cultivo do MEL1 na produção de melanina e estabeleceu uma condição otimizada (pré cultura:  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>; pH 6,8; 29°C; 1% água de maceração de milho (AMM) (v/v) e cultura: 10% do pré-inóculo; 0,2% AMM (v/v); 0,2% Tween 80 (v/v); 225 rpm) que levou ao aumento de 430% na produção de melanina pelo MEL1 em comparação a condição antes da otimização (pré-cultura:  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>; pH 6,8; 37°C; 1% AMM

(v/v) e cultura: 20% do pré-inóculo; 0,2% AMM (v/v); sem Tween 80 e 200 rpm) (SOUSA, 2017).

Tendo em vista que a biossíntese da melanina é resultado da polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos pela ação das polifenoloxidasas, determinar os possíveis indutores dessas enzimas pode promover uma maior melanização da biomassa do fungo. Na biossíntese de melanina em fungos, a lacase e tirosinase são as principais enzimas responsáveis pela polimerização deste pigmento. Íons de cobre podem atuar com indutores destas enzimas, devido ao fato de que o cobre atua como cofator enzimático no sítio catalítico de lacases (BALDRIAN, 2006) e tirosinases (RAMSDEN; RILEY, 2014). A presença dos substratos (L-tirosina e L-DOPA) das respectivas enzimas tem sido referenciada como indutores da melanização (GASPARETTI et al., 2012). Um estudo demonstrou que a L-tirosina aumentou a atividade de tirosinase em *Auricularia auricula*, resultando em maior produção de melanina (ZOU et al., 2016).

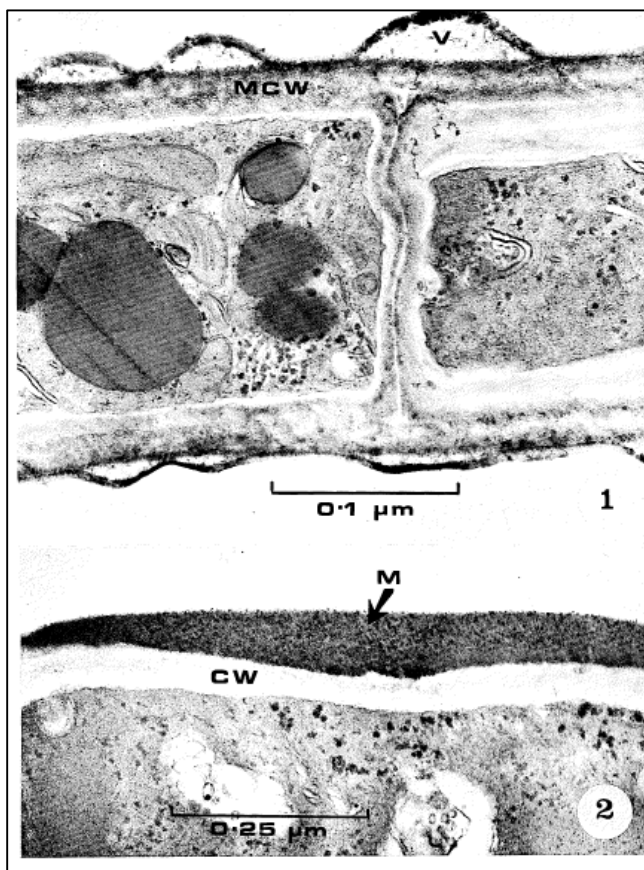
Neste contexto, o presente trabalho estudou o efeito de L-tirosina, L-DOPA, sulfato de cobre, glicose e ácido glutâmico na melanização do mutante MEL1 do fungo *A. nidulans* e sua ação na atividade das enzimas lacase e tirosinase produzida pelo MEL1, visando determinar possíveis indutores, bem como, determinar condições ótimas de cultivo para maximização da produção de melanina pelo MEL1.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Melanina e suas aplicações biotecnológicas

As melaninas são tipicamente de cor escura (geralmente pretas ou castanhas), insolúveis em fluídos aquosos ou orgânicos, resistentes ao ácido concentrado e susceptíveis ao branqueamento por agentes oxidantes (BUTLER, 1998). A melanina é sintetizada por organismos de todos os reinos, incluindo animais, bactérias, plantas e fungos (PAL et al., 2014; TOLEDO et al., 2017). Neste último, a melanina é encontrada em todos os filios e é, majoritariamente, depositada na parede celular (Figura 1) em associação com moléculas de quitina (BULL, 1970) relacionada ao processo de esporulação do micro-organismo, sendo requerido para a formação ou integridade de esporos sexual e assexual (WHITE, 1958), mas também podem ser encontradas como polímeros extracelulares (BUTLER; DAY, 1998).

Figura 1 – Micrografia de uma hifa de *Amorphotheca resiniae* mostrando parede celular hialina (CW); paredes celulares melanizadas (MCW); excrescências verrucosas (V) e depósitos externos de melanina (M).



Fonte: ELLIS; GRIFFITHS, 1974.

Vários estudos têm mostrado que o pigmento melanina confere ao fungo proteção contra a radiação ultravioleta, lise enzimática, dissecação, extremos de temperatura e outras condições ambientais adversas, aumentando o período de vida e a capacidade de competição por alimento em certos ambientes (PAGANO, 2015). Em estudos *in vitro* foi demonstrado que fungos melanizados são mais resistentes do que os não-melanizados aos danos induzidos por radiação UV ou mediada por oxidantes, às temperaturas extremas, enzimas hidrolíticas, toxicidade a metal pesado e drogas antimicrobianas (GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2014). A melanina possui uma capacidade única de interagir com uma ampla gama de frequências de radiação eletromagnética, funcionando assim como um pigmento protetor e de captação de energia. Ademais, a melanina desempenha papel importante na termorregulação de organismos, uma vez que a maior parte da energia da radiação da luz solar absorvida é convertida em calor (PRALEA et al., 2019).

Devido as suas propriedades físico-químicas e o seu amplo espectro de atividades biológicas, incluindo antioxidante, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, radioativa, antitumoral e imunoestimulante, a melanina apresenta potencial para ser utilizada em diversas aplicações biotecnológicas nas áreas da medicina, ambiental, farmacoscética e nanotecnologia (SOLANO, 2014; POMBEIRO-SPONCHIADO et al., 2017). Estudos realizado por Araujo et al. (2014) mostraram que nanopartículas de melanina como carreadores biocompatíveis de drogas pode ser considerado um dispositivo de liberação de drogas bastante promissor devido a sua capacidade de liberar a droga em resposta ao estímulo do pH, sendo utilizado para o tratamento de doenças de cólon e intestino. Foi observado que menos de 10% de antibiótico metronidazol foi liberado em condição ácida (pH 2,2) enquanto 87% da droga foi liberada em pH fisiológico (pH 7,4), sendo estes valores de pH semelhantes ao estômago e intestino.

A capacidade da melanina de ligar metais, em quantidades que variam de nano a micromolar por miligrama de massa fúngica seca melanizada (FOGARTY; TOBIN, 1996), tem sido explorada como estratégia na biorremediação de águas poluídas e recuperação de íons de metais. Saini e Melo (2013) relataram que a melanina pode ser utilizada como material adsorvente para recuperação de urânio em solução aquosa em uma ampla faixa de pH. Gadd e Rome (1988) demonstraram que biomassa melanizada de *A. pullulans* age como um eficiente agente adsorvente para

recuperação de íons de cobre em soluções ácidas, podendo ser uma importante ferramenta para biorremediação em ambientes contaminados. Por outro lado, a propriedade de absorção ultravioleta apresentada pela melanina tem sido utilizada para preparar lentes ou filtros ópticos e filtros solares (D'ISCHIA et al., 2015). Estudos demonstraram que é possível usar a melanina como pigmento absorvente ultravioleta em dispositivos oftálmicos (incluindo óculos de sol, óculos de esqui, lentes oftalmológicas e óculos de proteção), janelas, material de embalagem, guarda-chuvas, coberturas e outros meios semelhantes adequados para fornecer proteção contra radiação. Na indústria cosmética, há um grande interesse na melanina para proteger contra os efeitos nocivos da radiação UV pela incorporação em formulações de fotoproteção para a pele (D'ISCHIA et al., 2015; SOLANO, 2014).

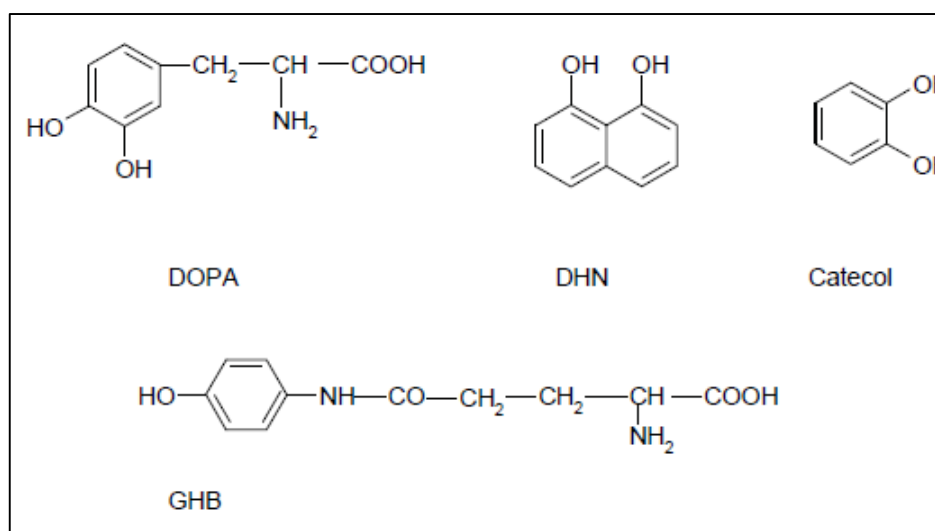
Nas últimas décadas a melanina ganhou grande importância comercial, resultando em um crescente interesse de indústrias tecnológicas que vêm desenvolvendo metodologias para testar o potencial da aplicação de filmes finos à base de melanina em eletrônica orgânica e bioeletrônica (D'ISCHIA et al., 2015). Bettinger et al. (2009) avaliaram o potencial da utilização de filmes finos de melanina como material semicondutor para aplicação em engenharia de tecidos, incluindo o uso como biomaterial para aplicações regenerativas neurais. Os autores concluem que a melanina exibe propriedades de condutividade elétrica e de superfícies adequadas, além de biocompatibilidade com tecido neural, que permitem que a melanina seja usada como biomaterial semicondutor para engenharia de tecidos (BETTINGER et al., 2009). Além disso, a integração de filmes finos de melanina com dispositivos eletrônicos à base de silício foi demonstrada por Ambrico et al. (2011) como promissora integração de materiais que combinam as propriedades elétricas e ópticas dos semicondutores com a versatilidade estrutural típicas de materiais orgânicos poliméricos.

Uma vez que o pigmento melanina apresenta potencial biotecnológico para ser utilizado como matéria-prima industrial, é necessário estabelecer rotas eficientes para a sua produção em larga escala. Neste sentido, torna-se importante estudar os fatores que afetam o processo de síntese do pigmento em fungos.

## 2.2 Síntese de melanina em fungos

A diversidade estrutural das melaninas em fungos é considerada muito superior à das melaninas animais. Os fungos podem sintetizar melanina a partir de  $\gamma$ -glutamil-3,4-di-hidroxibenzeno (GDHB-melanina), catecol (catecol-melanina), 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA-melanina), 1,8-di-hidroxi-naftaleno (DHN-melanina) e possivelmente de outros fenóis (Figura 2) (BUTLER; DAY, 1998). A origem do precursor aromático nem sempre é clara, mas em alguns casos as vias de policetídeo têm sido sugeridas para a biossíntese da melanina (HENSON et al., 1999). Embora seja conhecida essa diversidade de melaninas em fungos, os dois tipos mais comuns de melanina são DHN-melanina e DOPA-melanina.

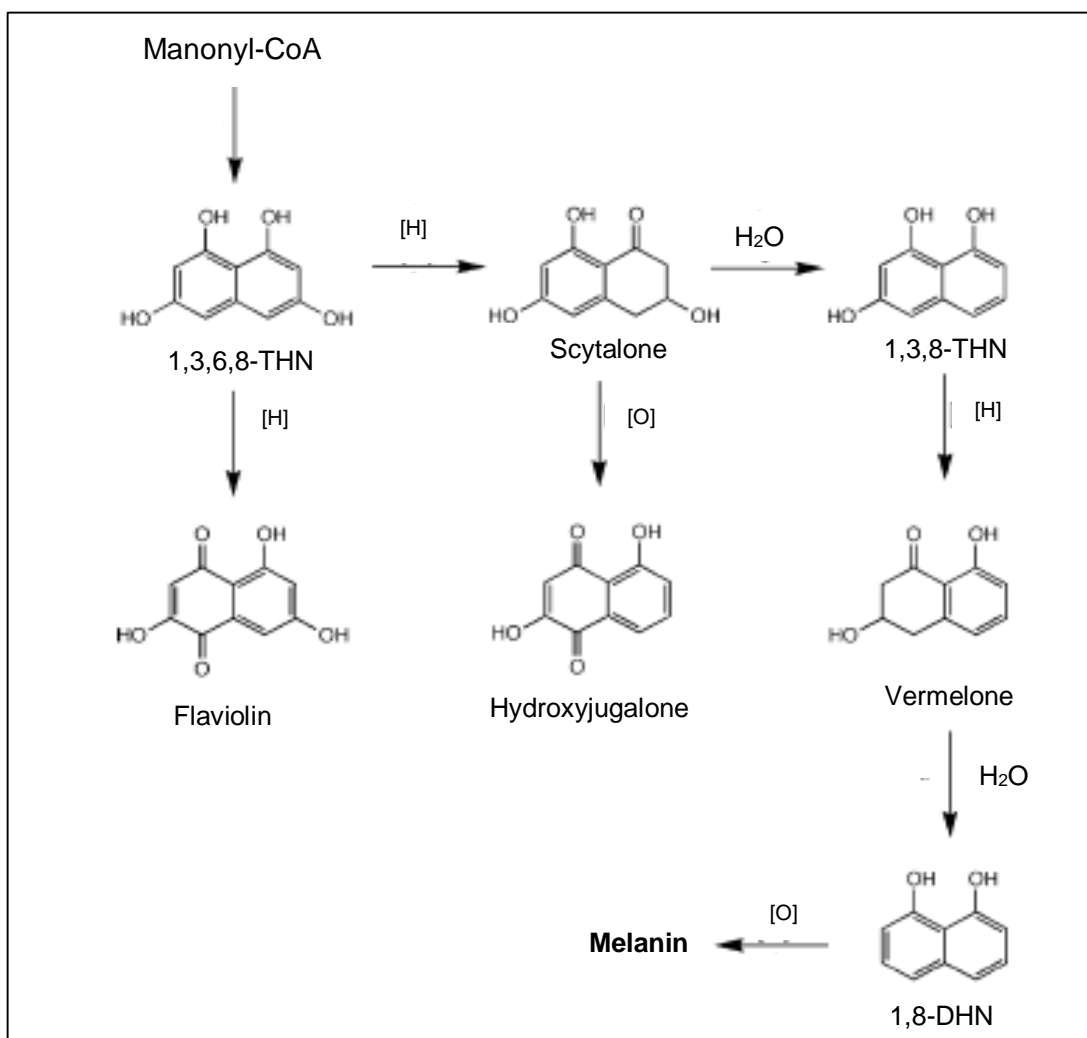
Figura 2 - Estruturas químicas dos precursores da melanina.



Fonte: BUTLER; DAY, 1998.

A síntese da DHN-melanina é dada pela via de policetídeo e foi descoberta estudando mutantes albinos de *Verticillium dahliae* (BELL; WHEELER, 1986). DHN-melanina é encontrada majoritariamente em ascomicetos e a via de policetídeos neste caso também é conhecida como via pentacetídica, uma vez que o anel naftalênico é formado pela ação da enzima policetídeo sintase na ciclização de cinco subunidades cetídicas obtidas de cinco moléculas precursoras de acetato. Como mostrado na Figura 3, uma série de reações de redução e desidratação leva a formação do precursor monomérico 1,8-di-hidroxi-naftaleno (1,8-DHN) (BUTLER; DAY, 1998; HENSON et al., 1999).

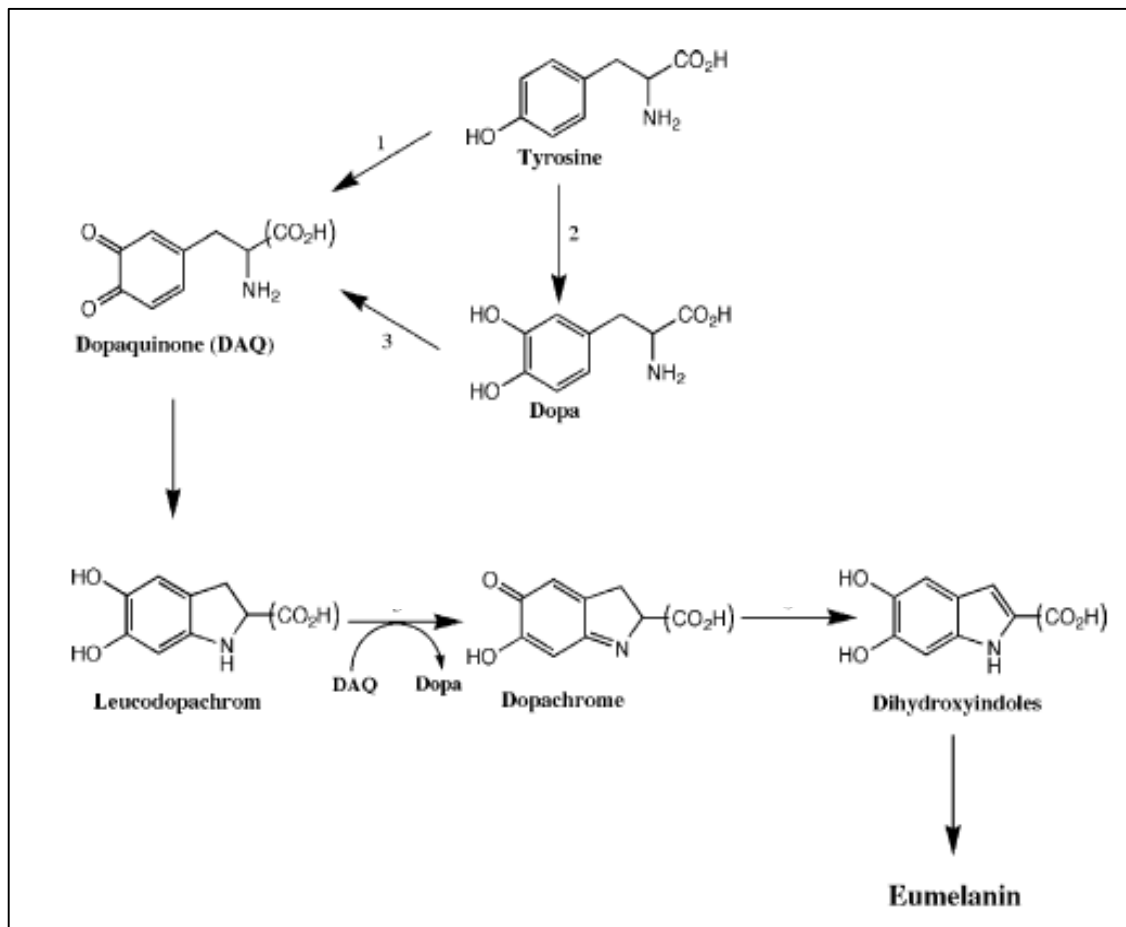
Figura 3 - Representação esquemática da biossíntese de DHN-melanina em fungos. Reações são indicadas: [O] – oxidação; [H] – redução e  $-H_2O$  desidratação. A polimerização de 1,8-DHN é catalisada por lacases.



Fonte: LANGFELDER et al., 2003

A DOPA-melanina é o principal tipo de melanina encontrada em animais, mas alguns fungos e bactérias também sintetizam este tipo de melanina (BUTLER; DAY, 1998). O DOPA (3,4-di-hidroxifenilalanina) utilizado para a biossíntese de melanina pode ser derivado diretamente da hidroxilação dos aminoácidos L-tirosina ou L-fenilalanina. O primeiro passo na síntese de melanina, que incluem a oxidação da tirosina para formar DOPA e depois a dopaquinona, é catalisado pela enzima tirosinase (Figura 4). No entanto é importante ressaltar que alguns fungos podem converter DOPA em melanina não apenas pela ação das tirosinases, mas também por lacases, polifenol-oxidases ou por oxidação espontânea sem nenhuma intervenção enzimática (BUTLER; DAY, 1998).

Figura 4 - Representação esquemática da biossíntese da DOPA-Melanina em fungos. Reações 1 e 2 são catalisadas por tirosinase e reação 3 pode ser catalisada por tirosinase ou lacase.



Fonte: LANGFELDER et al., 2003.

## 2.3 Mecanismo de ação da tirosinase e lacase

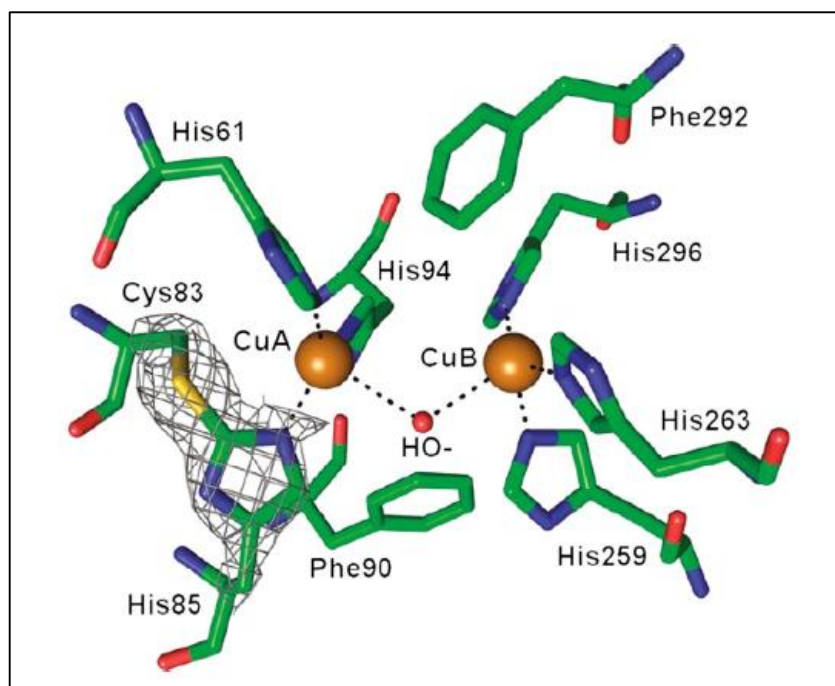
Como discutido acima, a biossíntese do pigmento DOPA-melanina acontece pela ação enzimática, principalmente da tirosinase e lacase, embora outras polifenoloxidasas possam levar à formação de melanina pela oxidação de fenóis (BUTLER; DAY, 1998). Neste contexto, entender o mecanismo da ação das enzimas tirosinase e lacase é importante para possibilitar aplicar estratégias de otimização da produção do pigmento, viabilizando a produção do pigmento em larga escala.

### 2.3.1 Tirosinase

A tirosinase (EC 1.14.18.1) é uma enzima com um centro ativo contendo dois átomos de cobre (geralmente identificados como CuA e CuB) fortemente conservado

entre os organismos pelo processo evolutivo e capaz de ligar o oxigênio molecular (Figura 5). Essa enzima é essencial para a biossíntese de melanina e também importante para a biossíntese de outros polímeros de fenol, como lignina, flavonoides e taninos (OBATA et al., 2004).

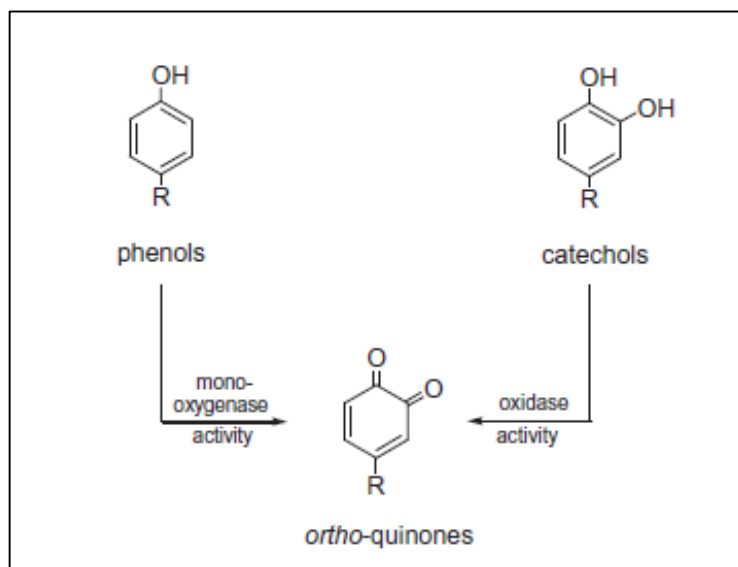
Figura 5 - Geometria do sítio de ligação binuclear de cobre da tirosinase em *Agaricus bisporus*.



Fonte: RAMSDEN; RILEY, 2014.

A tirosinase apresenta duas propriedades catalíticas; atividade monofenoloxidase ou creolase e difenoloxidase ou catecolase. Os substratos para a tirosinase são geralmente fenóis e catecóis, que pela atividade monofenoloxidase e difenoloxidase, respectivamente, formam orto-quinonas (Figura 6). As orto-quinonas tem uma longa história evolutiva que abrange muitas funções, incluindo secreções defensivas, adesão de balanídeos (crustáceos sésseis), endurecimento cuticular em insetos e a formação do pigmento melanina em animais, plantas e micro-organismos (RAMSDEN; RILEY, 2014).

Figura 6 - Vias de oxidação catalisada por tirosinase.



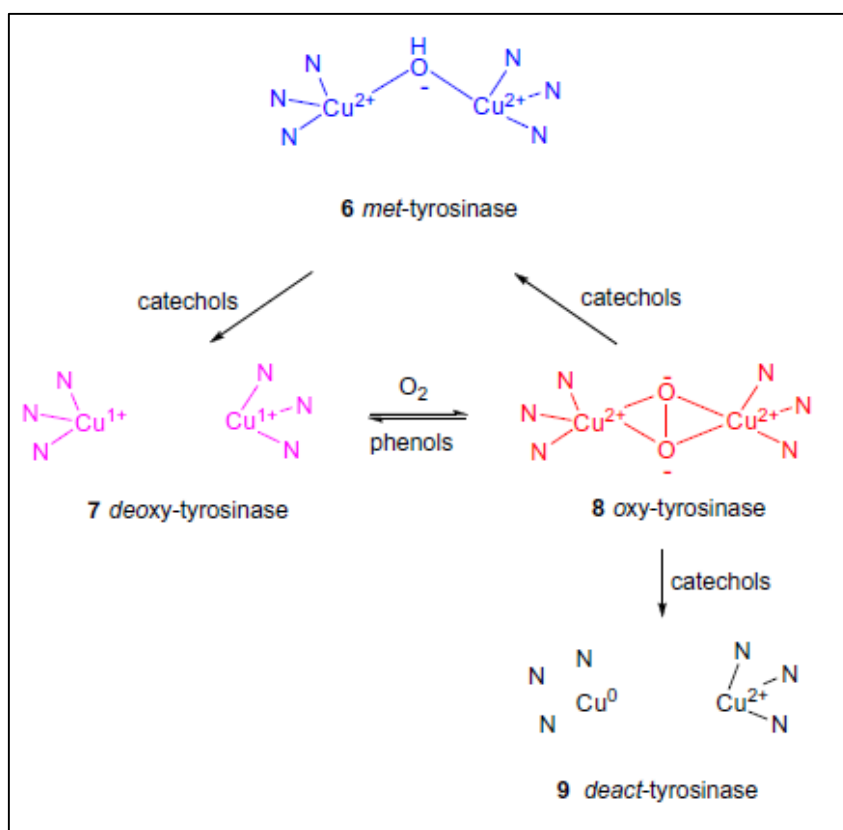
Fonte: RAMSDEN; RILEY, 2014.

A tirosinase é caracterizada por possuir quatro estados (desoxi, oxi, met e deact-tirosinase) que são determinados dependendo dos estados de oxidação dos dois átomos de cobre no sítio ativo e que também afetam suas propriedades catalíticas (RAMSDEN; RILEY, 2014). A tirosinase nativa ocorre principalmente como met-tirosinase, na qual um íon hidroxila é ligado aos dois íons de cobre. Os fenóis se ligam à met-tirosinase, mas não são oxidados. Os catecóis, no entanto, são oxidados pela met-tirosinase, que no processo é reduzida a desoxi-tirosinase, levando os dois átomos de cobre para o estado de oxidação Cu (I). A desoxi-tirosinase liga-se rapidamente a um oxigênio molecular ( $O_2$ ) formando o estado oxi-tirosinase. Neste estado dois átomos de oxigênio são mantidos entre os íons de cobre no sítio ativo da enzima. A oxi-tirosinase é a responsável pela oxidação de fenóis pela atividade de mono-oxigenase (monofenoloxidase) e catecóis pela atividade de oxidase (difenoloxidase) (RAMSDEN; RILEY, 2014).

Durante a reação catalítica da oxi-tirosinase (Figura 7), o oxigênio do fenol se liga ao CuA seguido por mono-oxigenação eletrofílica do anel, levando a um complexo no qual o substrato está ligado aos dois íons de cobre. Este complexo sofre dissociação homolítica para originar a orto-quinona e converte a oxi-tirosinase para o estado desoxi-tirosinase. Em seguida, desoxi-tirosinase se liga ao oxigênio para regenerar a oxi-tirosinase e o ciclo de oxidação do fenol se reinicia e continua até que

os substratos (fenol e oxigênio) sejam esgotados ou ocorra uma inativação da enzima (RAMSDEN; RILEY, 2014). Essa inativação da enzima pode ocorrer durante o ciclo catecólico, onde um catecol pode ocasionalmente ser tratado como monofenol e oxidado pela oxi-tirosinase por um mecanismo de mono-oxigenase, levando à formação irreversível da deact-tirosinase. Neste estado um dos átomos de cobre do sítio ativo da enzima é reduzido ao estado Cu (0) e pode se desprender do sítio ativo, essa via leva à inativação total da enzima (Figura 7).

Figura 7 - Estados de oxidação dos átomos de cobre no sítio ativo da tirosinase são: met-tirosinase (6), com ambos os átomos de cobre na forma de Cu (II); desoxi-tirosinase (7) com os átomos de cobre no estado Cu (I) e capaz de se ligar ao oxigênio molecular; oxi-tirosinase (8) na qual o oxigênio molecular é coordenado com os átomos de cobre em uma conformação peroxi; e deact-tirosinase (9) inativada com um dos átomos de cobre no estado Cu (0).

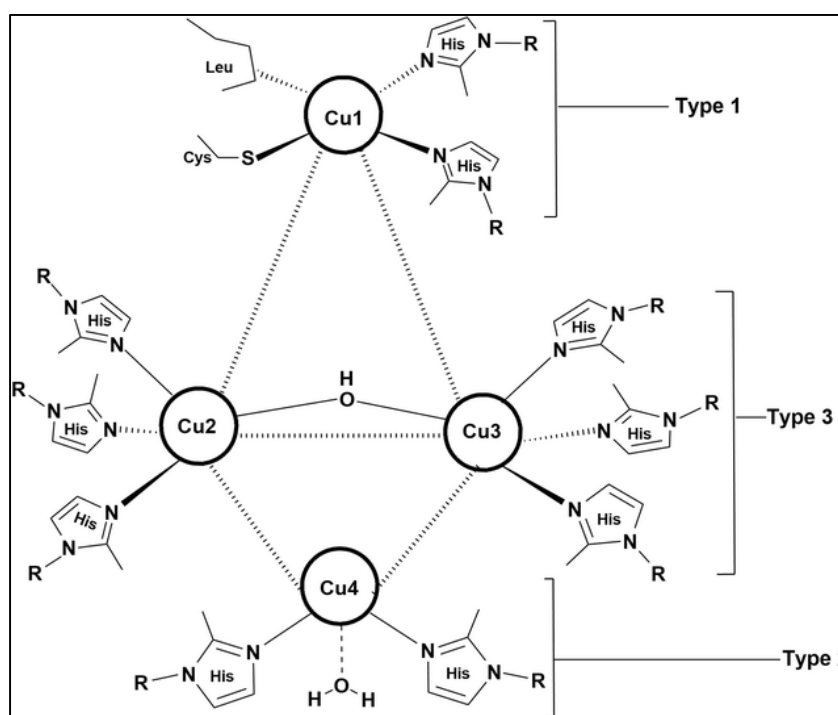


Fonte: RAMSDEN; RILEY, 2014.

### 2.3.2 Lacase

Lacase [benzenodiol: oxidoreductase; E.C. 1.10.3.2] é uma polifenol oxidase, com átomos de cobre em seu sítio ativo, geralmente contendo três tipos de centro de cobre, um dos quais confere sua característica cor azul (Figura 8). Lacase apresenta a capacidade de catalisar a oxidação de uma ampla variedade de compostos aromáticos orgânicos, concomitantemente com a redução do oxigênio molecular (CHAURASIA et al., 2013).

Figura 8 - Centros de cobre da lacase: Tipo 1, Tipo 2 e Tipo 3. O centro Tipo 1 confere cor azul, o centro Tipo 2 é coordenado por dois resíduos de histidinas e está estrategicamente posicionado próximo ao centro Tipo 3. O centro Tipo 3 e o Tipo 2 formam um “cluster” tri nuclear, onde o oxigênio molecular é reduzido e ocorre a liberação de água.



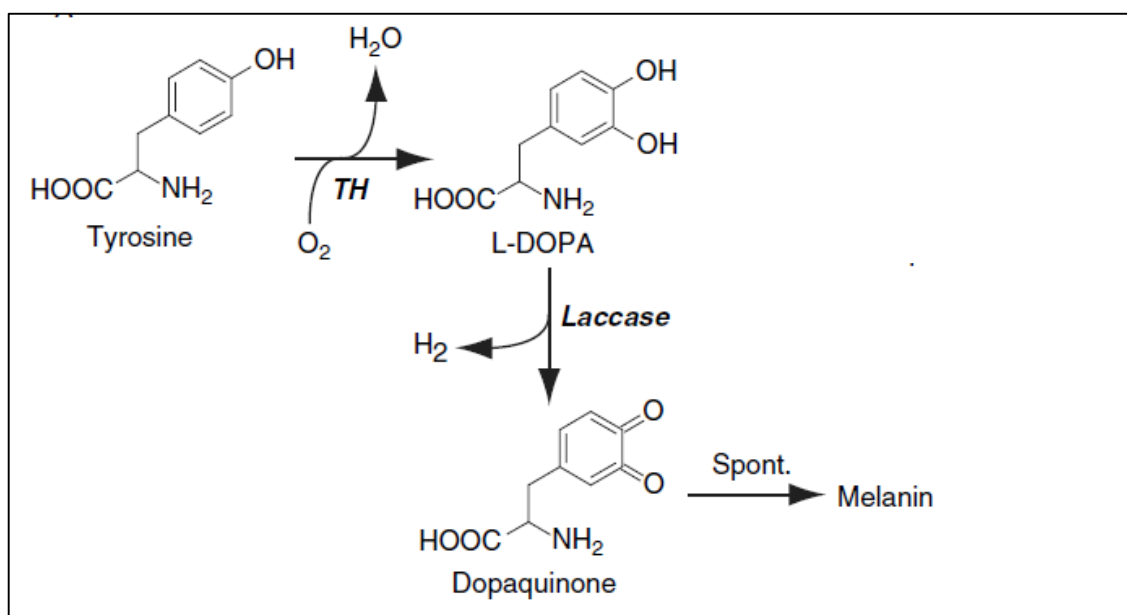
Fonte: AGRAWAL et al., 2018.

A lacase é uma enzima ligninolítica bastante comum em fungos causadores da podridão de biomassa vegetal, em fungos saprófitos do solo e em fungos comestíveis. Esses fungos produtores de lacase são geralmente chamados de fungos degradadores de madeira (BALDRIAN, 2006). Um grande número de lacases são produzidas por fungos, principalmente basidiomicetos e ascomicetos, sendo muito comum mais de um tipo de lacase ser expresso em uma mesma linhagem fúngica. Uma variedade de funções fisiológicas tem sido sugerida para as lacases em fungos,

incluindo morfogênese, proteção a estressores ambientais e interação patógeno/hospedeiro (SAPMAK et al., 2015).

Evidências na literatura confirmam o papel da lacase na produção de melanina em fungos. A lacase oxida L-DOPA em dopaquinona que pode ser convertida espontaneamente em DOPA-melanina (Figura 9) (EISENMAN et al., 2007). Sapmak et al. (2015) demonstraram que o gene *lac1* em *Cryptococcus neoformans* codifica uma lacase que quando excluído leva os mutantes a não sintetizarem a DOPA-melanina. Enquanto que *Penicillium marneffeii* é capaz de sintetizar tanto DHN- quanto DOPA-melanina pela atividade de lacase (SAPMAK et al., 2015).

Figura 9 - Atividade de lacase e estruturas de polifenóis. TH, tirosina hidroxilase.



Fonte: Adaptado de FOWLER et al, 2011

Estudos têm mostrado que lacase também participa da via de síntese de DHN-melanina. Lin et al. (2012) relataram que o fungo fitopatogênico *Gaeumannmyces graminis* produz DHN-melanina a qual é responsável pela melanização das hifas durante o processo de infecção. Segundo os autores, a lacase purificada das hifas de *G. graminis* foi capaz de polimerizar DHN-melanina *in vitro*. Em estudos com *Aspergillus nidulans*, foi identificado o gene *yA* que codifica para a enzima lacase, a qual converte um precursor amarelo em um pigmento verde, levando a coloração típica dos conídios deste fungo, sendo que a sua expressão acontece durante o desenvolvimento assexuado (CLUTTERBUCK, 1972). Outro estudo isolou um segundo

gene para lacase em *A. nidulans*, denominado pelos autores de *tilA* (do inglês *Tip Laccase*) em referência a enzima estar localizada na região apical de hifas em crescimento (SCHERER; FISCHER, 2001). Os autores sugerem que a lacase *tilA* pode estar envolvida na melanização das hifas devido a sua localização na região apical das hifas em crescimento e porque análises filogenéticas mostraram que o gene *tilA* tem como seu homólogo mais próximo o gene *Abr2* de *Aspergillus fumigatus*, gene que codifica a lacase responsável pela polimerização de DOPA-melanina em *A. fumigatus* (SCHERER; FISCHER, 2001).

Estudos relacionando a atividade da lacase com a melanização em fungos têm despertado grande interesse na área médica, pelo fato que a melanização é um fator fundamental na virulência de fungos patogênicos. Por exemplo, em *C. neoformans*, a enzima lacase tem sido apontada como um potencial alvo para a ação de drogas usadas no tratamento de infecções em humanos, como criptococose (EISENMAN et al., 2007; SCHERER; FISCHER, 2001).

#### **2.4 Efeito de indutores na melanização em fungos**

Uma vez que a biossíntese da melanina em fungos é resultado da polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos pela ação da lacase e/ou tirosinase, estudar os possíveis indutores e o substrato dessas enzimas apresenta-se como uma metodologia promissora para promover uma maior melanização da biomassa do fungo. Galhaup e Haltrich (2001) constatou que na presença de íons cobre o micélio de *Trametes pubescens* apresentou maior melanização, sendo que a concentração de melanina na parede celular aumentou em resposta da concentração de cobre. O cobre, como mencionado anteriormente, pode atuar de diferentes modos de ação, como cofator enzimático no sítio catalítico de lacase e tirosinase (BALDRIAN, 2006; BALDRIAN, 2003; CORDERO e CASADEVALL, 2016), indutor da expressão de lacase (PASSARINI et al., 2015) e também influenciando de forma positiva a ação enzimática e a estabilidade de lacases (CHEN et al., 2002).

Estudos tem mostrado que a concentração de carbono e nitrogênio também exerce ação reguladora na expressão das enzimas relacionadas com a melanização. Hernandez et al. (2015) sugerem a existência de um sistema regulatório que inibe a produção de lacase quando há grande disponibilidade de carbono e nitrogênio,

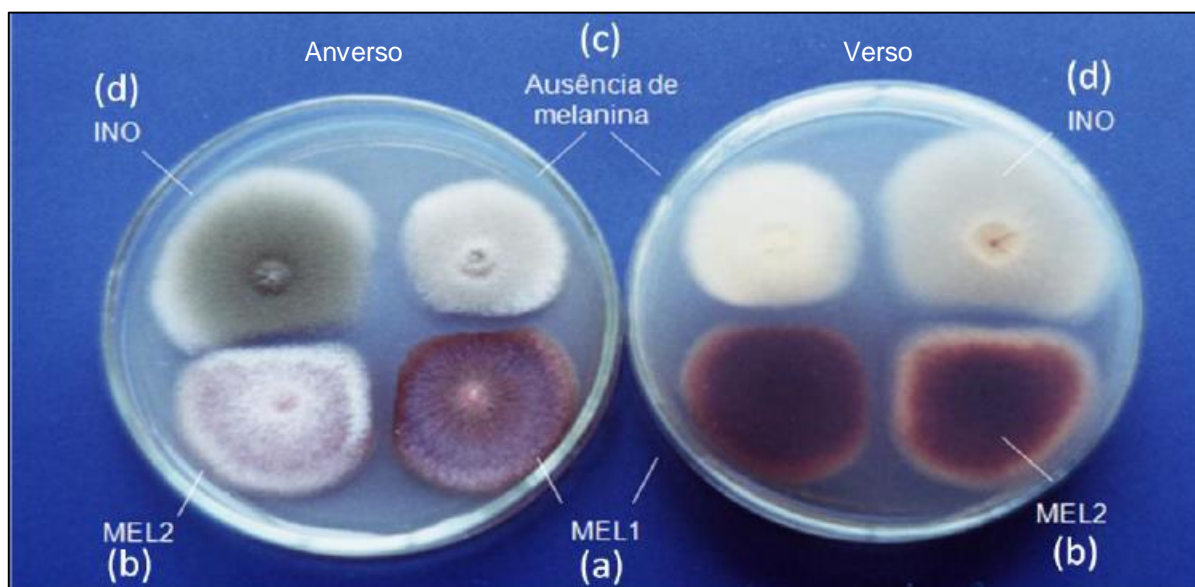
demonstrando o papel significativo dessas fontes na regulação da produção/atividade dessa enzima durante o metabolismo secundário. Além disso, em trabalho realizado por Sun et al. (2015) o nitrogênio também foi observado como fator importante no processo de melanização, pois a falta de nitrogênio inibiu tanto o crescimento micelial quanto a produção de tirosinase em *Auricularia auricula*. Szilágyi et al. (2017) concluíram que a produção de melanina em *A. nidulans* era aumentada em condições de pouca disponibilidade de carbono e, segundo seus dados, a melanização foi induzida para proteger as células viáveis da ação de enzimas secretadas para autólise de hifas mortas. Esses resultados confirmaram as observações feitas por Martinelli e Bainbridge (1974), que já haviam demonstrado que a melanização em *A. nidulans* ocorre na fase estacionária, provavelmente como consequência da exaustão nutricional do meio.

A presença dos substratos das enzimas também é frequentemente referenciada como indutores para melanização. A tirosinase pode utilizar uma grande quantidade de substratos mono e difenólicos, sendo a L-tirosina e L-DOPA os precursores naturais da melanina (GASPARETTI et al., 2012). Duarte et al. (2012), por exemplo, demonstrou que as condições ótimas para atividade de tirosinase em linhagens de *Pycnoporus sanguineus* foi com a presença de 0.15% de L-tirosina. De acordo com Sun et al. (2016) existe uma relação positiva para concentração de L-tirosina e a produção de melanina em *Auricularia auricula*. Estudos realizados por Almeida-Paes et al. (2009) mostrou que na ausência de L-DOPA algumas linhagens de *Sporothrix schenckii* não apresentaram melanização. Eisenman et al. (2011) demonstraram efeito positivo de L-DOPA na melanização de *Cryptococcus neoformans*. Outros estudos demonstraram que L-DOPA é essencial para melanização de *Malassezia furfur* (YOUNGCHIM et al., 2013).

## **2.5 Linhagem melanizada do fungo *Aspergillus nidulans***

O nosso grupo de pesquisa vem estudando uma linhagem mutante do fungo *A. nidulans* (denominada MEL1), que apresenta um maior grau de melanização em comparação à linhagem selvagem. O mutante MEL1 foi selecionado por Pombeiro (1991) após tratamento da linhagem INO (auxotrofia para inositol) com o agente mutagênico 4-nitroquinolina-1-óxido (NQO) (Figura 10).

Figura 10 - Crescimento das linhagens selvagem e mutantes do fungo *A. nidulans*. (a e b) linhagens mutantes com produção excessiva de melanina, denominadas MEL1 e MEL2; (c) linhagem mutante com ausência de melanina e (d) linhagem parental com auxotrofia para inositol, denominada INO.



Fonte: GONÇALVES, 2008.

Estudos de grupo de pesquisa mostraram que o pigmento produzido pelo MEL1 pode ser considerado com DOPA-melanina por apresentar propriedades físico-químicas e perfis espectrofotométrico UV/VIS e IR muito semelhantes ao da DOPA-melanina sintética. Além disso, nos ensaios com o triciclazol (inibidor da via de síntese da DHN-melanina) a produção de melanina pelo mutante não foi inibida, enquanto que na presença do inibidor da biossíntese de DOPA-melanina (tropolone) a linhagem MEL1 não apresentou melanização, indicando que a melanina produzida pelo mutante do *A. nidulans* (MEL1) é do tipo DOPA-melanina (GONÇALVES et al., 2012). Outros estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que esse pigmento possui atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, não apresentando efeitos citotóxico e mutagênico (GONÇALVES et al., 2012; GONÇALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2005; GONÇALVES et al., 2015; GONÇALVES et al., 2013). Estes resultados indicam que o pigmento melanina produzido pelo mutante MEL1 tem potencial biotecnológico para ser usado em formulação farmacêuticas e/ou cosméticas, visando proteger a pele contra possíveis danos oxidativos, processos inflamatórios e agentes microbianos.

No entanto, para viabilizar a aplicação prática deste pigmento é necessário conhecer os mecanismos e os fatores responsáveis pela indução da síntese de melanina em fungos. Em *A. nidulans*, o processo de melanização parece ser mediado pelas enzimas tirosinase e lacase em função da sua especificidade pelo substrato tirosina e a susceptibilidade aos inibidores, porém ainda não foi demonstrada a correlação destas enzimas com a produção de melanina neste fungo. Neste sentido, identificar as enzimas envolvidas na biossíntese da melanina no mutante MEL1 e determinar os possíveis indutores da melanização da biomassa é de fundamental importância para viabilizar a produção do pigmento para futuras aplicações biotecnológicas.

### 3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como principal objetivo estudar o efeito de L-tirosina, L-DOPA, glicose, ácido glutâmico e sulfato de cobre na melanização do mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans*, buscando maximizar a produção do pigmento melanina pelo MEL1. Além disso, buscou-se correlacionar a atividade enzimática das enzimas lacase e tirosinase do MEL1 com sua melanização. Para tanto, para o presente estudo estabeleceu-se os seguintes objetivos específicos:

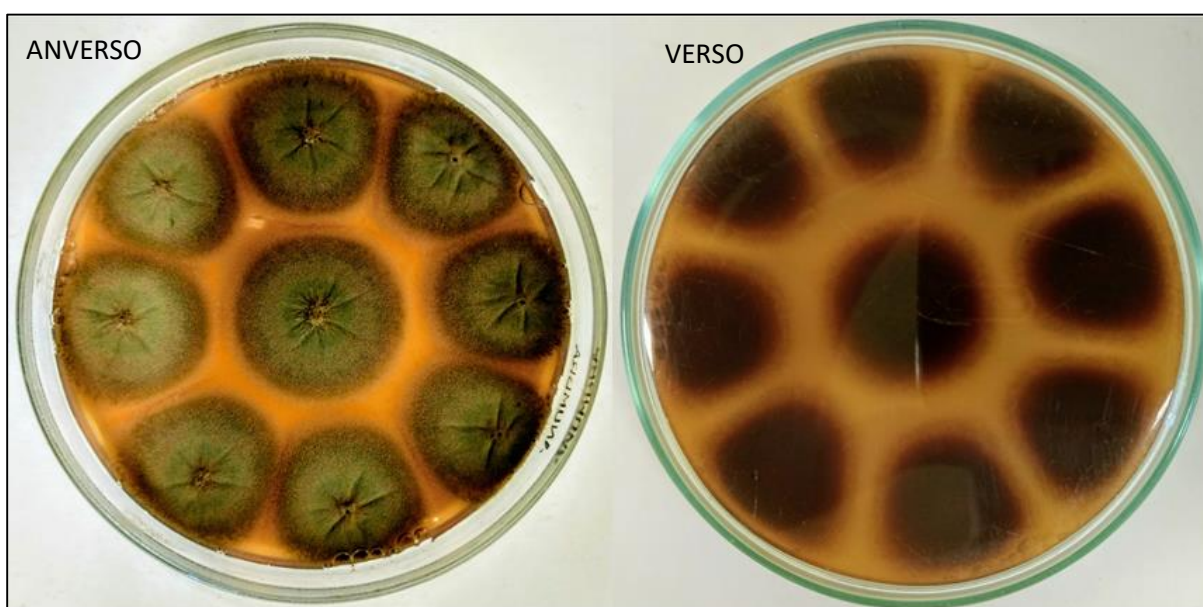
1. Avaliar o efeito de L-tirosina, glicose, L-DOPA, sulfato de cobre e ácido glutâmico na produção de melanina pelo mutante MEL1.
2. Determinar as condições ótimas para maior produção do pigmento melanina pelo mutante MEL1, estudando os níveis dos fatores que influenciam positivamente no processo de melanização.
3. Avaliar a atividade das enzimas lacase e tirosinase produzidas pelo MEL1 após o cultivo do fungo na condição antes e após otimização.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Mutante MEL1

Para a realização deste trabalho foi utilizado o mutante MEL1 do fungo filamentososo *Aspergillus nidulans* (Figura 11), o qual apresenta auxotrofia para inositol (*inoB2*) e produção excessiva do pigmento melanina (*melC1*). Esta linhagem está estocada no laboratório de Fungos Filamentosos do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química da UNESP Araraquara.

Figura 11 - Mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* crescido em meio mínimo suplementado com glicose ( $55 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), nitrato de sódio ( $70 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) por cinco dias a  $37^\circ\text{C}$ .



Fonte: Autoria própria

### 4.2 Meio de cultivo

Para o crescimento da linhagem foi utilizado meio mínimo descrito por Cove (1966) com a seguinte composição: 10 mL de solução de sais (descrito abaixo), 1 mL de solução de elementos traços (descrito abaixo) e a quantidade de água destilada suficiente para completar 1000 mL. Após autoclavagem  $121,1^\circ\text{C}$  ( $1 \text{ kgf/cm}^2$ ) por 20 minutos, o meio foi suplementado, de maneira asséptica, com glicose ( $55 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) como fonte de carbono, nitrato de sódio ( $70 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) e/ou ácido glutâmico ( $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) como fonte de nitrogênio, inositol ( $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ) como requerimento nutricional e, de acordo com o planejamento experimental (descrito no item 4.6), foram adicionadas as

substâncias a serem avaliadas (L-tirosina, L-DOPA e sulfato de cobre). Para meio solidificado, foi adicionado 1,5% de ágar antes da autoclavagem.

- Solução de sais (COVE, 1966):
  - Fosfato de potássio monobásico – 14,0 g
  - Fosfato de potássio bibásico – 6,86 g
  - Cloreto de potássio – 1,0 g
  - Sulfato de magnésio – 1,0 g
  - Água destilada até completar 100 mL
  
- Solução de elementos traços (COVE, 1966):
  - Borato de sódio – 40 mg
  - Sulfato de cobre – 400 mg
  - Sulfato de ferro – 532 mg
  - Molibdato de sódio – 800 mg
  - Sulfato de zinco – 8 mg
  - Água destilada até completar 100 mL.

### **4.3 Suspensão de esporos**

Após o crescimento da linhagem MEL1 em meio mínimo solidificado (como descrito no item 4.2) por cinco dias a 37°C, foi realizada a coleta dos conídios em solução de NaCl 0,85% (m/v). Em seguida, o número de conídios por mililitro foi estimado por meio de contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio. A partir deste método, foi determinado o volume necessário de inóculo para obter a concentração final de  $10^6$  conídios/mL de meio.

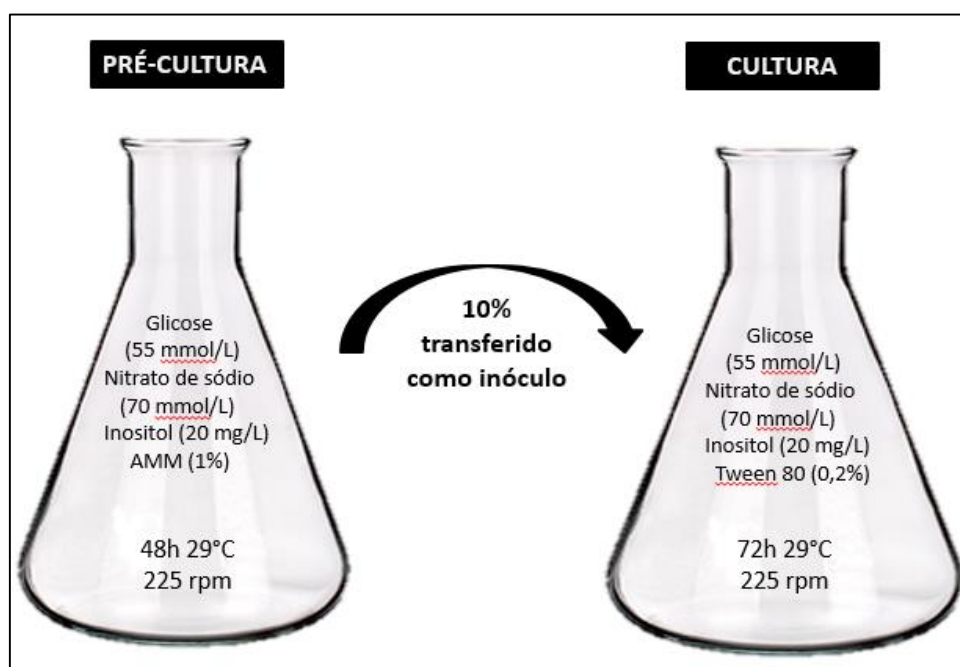
### **4.4 Cultivo do fungo**

Como estabelecido em trabalhos anteriores (PRETTI, 2009), uma maior melanização do mutante MEL1 ocorreu quando o cultivo foi realizado em duas etapas: pré cultura seguida da cultura propriamente dita (Figura 12).

A etapa da pré cultura foi realizada em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio mínimo (descrito no item 4.2) e suplementado com glicose

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

Figura 12 - Metodologia de cultivo do mutante MEL1 em duas etapas: 1º pré cultura inoculado com 10<sup>6</sup> conídios.mL<sup>-1</sup> e 2º cultura inoculado com 10% da biomassa obtida na etapa de pré cultura.



Fonte: Autoria própria

Para a etapa da cultura foi utilizado meio com a mesma composição da etapa anterior com exceção da adição de 0,2% (v/v) de solução Tween 80 e das substâncias avaliadas no planejamento experimental (como descrito no item 4.6). Após inoculação de 10% da massa micelial, obtida na pré cultura, os frascos foram mantidos sob agitação constante de 225 rpm à 29 °C por 72h. Após este período, a biomassa foi separada do meio de cultivo por filtração a vácuo e seca em estufa a 60 °C até atingir peso constante. A biomassa seca foi utilizada para extração e quantificação da melanina.

Como condição controle (antes da otimização) foi realizado o cultivo do MEL1 nas mesmas condições descritas acima, exceto que na etapa de cultura foi adicionado 0,2% (v/v) de AMM e nenhuma das substâncias avaliadas.

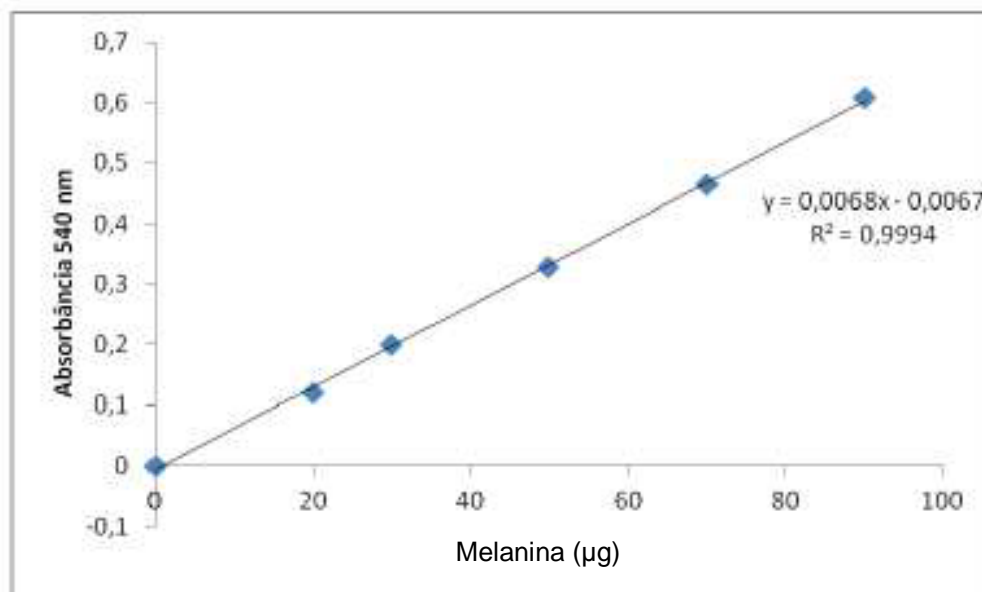
#### **4.5 Extração e quantificação de melanina**

A extração do pigmento melanina presente na biomassa foi feita seguindo o método descrito por Sava et al. (2001), com algumas modificações. Em tubos falcon de 50 mL contendo a biomassa pulverizada em almofariz, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH)  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , na proporção 1:30 (m/v), seguida de autoclavagem a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $1 \text{ kgf/cm}^2$ ) por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante contendo o pigmento solubilizado foi separado da biomassa por centrifugação a  $2576 \text{ xg}$  por 15 minutos. Este procedimento foi repetido várias vezes até a completa descoloração da biomassa.

Posteriormente, o sobrenadante contendo o pigmento solubilizado foi acidificado com ácido clorídrico (HCl) concentrado até pH 2, deixado em repouso por 72h e, em seguida, fervido por 10 minutos. Este procedimento visa promover a precipitação do pigmento melanina devido a propriedade da melanina ser insolúvel em pH ácido. Em seguida, a suspensão ácida contendo o pigmento precipitado foi separada por centrifugação a  $2575 \text{ xg}$  por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em água destilada. Foram realizadas lavagens do pigmento em água destilada seguida de centrifugação a  $2576 \text{ xg}$  por 15 minutos. A etapa de lavagem do precipitado (contendo o pigmento) em água destilada foi realizado até neutralizar pH. O pigmento obtido foi colocado na estufa a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24h para secagem.

Para quantificar a melanina presente no pigmento extraído da biomassa foi utilizada a metodologia descrita por Bull (1970). A amostra foi preparada na concentração de  $1 \text{ mg de pigmento.mL}^{-1}$  de NaOH  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro usando o comprimento de onda de  $540 \text{ nm}$ . A concentração da melanina foi determinada a partir do coeficiente de absorvidade obtido da curva analítica da DOPA melanina sintética (Sigma-Aldrich), usada como padrão (Figura 13).

Figura 13 - Curva analítica DOPA-melanina sintética utilizada como referência para quantificação da melanina.



Fonte: SOUZA, 2017.

#### 4.6 Efeito do ácido glutâmico na produção de melanina pelo mutante MEL1.

Foi realizado um estudo para avaliar a melanização do MEL1 em resposta a presença de ácido glutâmico. Para isto, foi realizado experimentos com os seguintes tratamentos na fase da cultura:

- Tratamento 1 – Nitrato de sódio ( $70 \text{ mmol.L}^{-1}$ )
- Tratamento 2 – Ácido glutâmico ( $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ )
- Tratamento 3 – Ácido glutâmico ( $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) + Nitrato de sódio ( $70 \text{ mmol.L}^{-1}$ )

Condições da pré cultura permaneceram sempre iguais e de acordo ao descrito nos itens 4.3. Além disso, a fase da cultura não foi suplementada com AMM e entre os tratamentos apresenta diferenças apenas quanto a fonte de nitrogênio, sendo o tratamento 1 considerado controle.

As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) e complementado com teste de Tukey, por meio do software Statistica v.10.

#### 4.7 Planejamento experimental

Foi elaborado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar o grau da melanização do MEL1 em resposta a cinco fatores: L-tirosina, glicose, ácido glutâmico, L-DOPA e sulfato de cobre. Os níveis selecionados para o DCCR para cada fator foram estabelecidos em função de resultados obtidos anteriormente e estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis de cada fator (variável independente) estudado para a resposta produção de melanina ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) pelo mutante MEL1.

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

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 2 apresenta a matriz de ensaios do DCCR. Cada linha da matriz representa um ensaio com combinações de diferentes concentrações de cada fator. Os valores +1 representam os níveis superiores, os valores -1 representam os níveis inferiores e os 0 (zero) representam a média aritmética entre os dois níveis (pontos centrais) de cada fator. Além disso, em planejamentos do tipo DCCR também são estudados os níveis axiais. O que possibilita verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão (RODRIGUES ; IEMMA, 2005). Os pontos axiais variam de acordo com o número de fatores estudados no planejamento e seus valores são determinados pela equação

$$\alpha = [2^k]^{1/4}$$

Onde  $k$  representa o número de fatores estudados. Neste estudo, os valores axiais obtidos foram -2,378 e 2,378.

Tabela 2 - Matriz dos ensaios do DCCR para resposta produção de melanina ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) pelo mutante MEL1.

(Continua)

Ensaio	L-tirosina ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )	Glicose % (v/v)	Ác. Glutâmico ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )	L-DOPA ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )	Sulfato de cobre ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
1	1,4 (-1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)
2	3,4 (+1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)
3	1,4 (-1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)
4	3,4 (+1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)
5	1,4 (-1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)
6	3,4 (+1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)
7	1,4 (-1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)
8	3,4 (+1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)
9	1,4 (-1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)
10	3,4 (+1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)
11	1,4 (-1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)
12	3,4 (+1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)
13	1,4 (-1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)
14	3,4 (+1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)
15	1,4 (-1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)
16	3,4 (+1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)
17	1,4 (-1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	18 (+1)
18	3,4 (+1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	19 (+1)
19	1,4 (-1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	20 (+1)
20	3,4 (+1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	21 (+1)
21	1,4 (-1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	22 (+1)
22	3,4 (+1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	23 (+1)
23	1,4 (-1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	24 (+1)
24	3,4 (+1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	25 (+1)
25	1,4 (-1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	26 (+1)
26	3,4 (+1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	27 (+1)
27	1,4 (-1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	28 (+1)
28	3,4 (+1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	29 (+1)
29	1,4 (-1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	30 (+1)

Fonte: Autoria própria

Tabela 2 - Matriz dos ensaios do DCCR para resposta produção de melanina (mg.g-1) pelo mutante MEL1.

Ensaio	L-tirosina (mmol.L <sup>-1</sup> )	Glicose % (v/v)	Ác. Glutâmico (mmol.L <sup>-1</sup> )	L-DOPA (mmol.L <sup>-1</sup> )	(Conclusão)
					Sulfato de cobre (µmol.L <sup>-1</sup> )
30	3,4 (+1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	31 (+1)
31	1,4 (-1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	32 (+1)
32	3,4 (+1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	33 (+1)
33	0,02 (-2,38)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)
34	4,78 (+2,38)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)
35	2,4 (0)	0,11 (-2,38)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)
36	2,4 (0)	2,49 (+2,38)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)
37	2,4 (0)	1,3 (0)	0,74 (-2,38)	2,4 (0)	12,75 (0)
38	2,4 (0)	1,3 (0)	10,26 (+2,38)	2,4 (0)	12,75 (0)
39	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	0,02 (-2,38)	12,75 (0)
40	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	6,85 (+2,38)	12,75 (0)
41	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	0,27 (-2,38)
42	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	25,23 (+2,38)
43	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)
44	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)
45	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)
46	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)

Fonte: Autoria própria

Os resultados do DCCR foram validados experimentalmente utilizando como parâmetro a ferramenta de função de desejabilidade. Neste sentido, o modelo prevê um valor esperado para produção de melanina com os fatores ajustados em seus valores (níveis) ótimos. Para fins de validação, os resultados do ensaio de validação foram comparados com o predito pela função de desejabilidade e foi admitido 90% como índice de confiabilidade ( $p < 0,1$ ).

#### 4.8 Avaliação das enzimas tirosinase e lacase produzidas pelo MEL1

Com o objetivo de analisar uma possível correlação entre melanização do MEL1 e a atividade das enzimas tirosinase e lacase, foi realizado o cultivo do fungo

nos tempos de 24, 48 e 72h nas condições antes e após otimização. Em cada intervalo de 24h, a cultura foi filtrada a vácuo para separação da massa micelial. Parte desta massa foi seca em estufa a 60 °C para determinar produção de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e posteriormente foi realizada a extração do pigmento e a quantificação da melanina. Com a outra parte da biomassa foi obtido o extrato enzimático, no qual foi determinado as atividades de tirosinase e lacase, conforme metodologia a seguir.

#### **4.8.1 Preparação de extrato enzimático livre de célula**

A biomassa foi pulverizada no almofariz usando nitrogênio líquido e solubilizada em tampão de extração (Tris-HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; EDTA  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , PMFS  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) na proporção de 1:2 (m/v), agitado por 1 minuto no vórtex e centrifugado a  $9000 \text{ xg}$  por 10 minutos (BRIDGE; KOKUBUN; SIMMONDS, 2004). O precipitado contendo os detritos celulares foi descartado e o sobrenadante (extrato enzimático) foi utilizado para os ensaios das atividades de tirosinase e lacase.

#### **4.8.2 Atividade de tirosinase**

Para determinar a atividade de tirosinase foi utilizada metodologia descrita por Horowitz (1960) com modificações. O meio reacional consistiu de 1,0 mL de tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) pH 6,8; 0,6 mL de extrato enzimático e 0,4 mL de substrato L-DOPA. O substrato L-DOPA foi solubilizado no mesmo tampão ( $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Como controle negativo foi utilizado o extrato enzimático fervido por 5 minutos a 100 °C.

A atividade tirosinase foi avaliada pela formação de dopacromo, em função do aumento da absorbância em 475 nm após cinco minutos de reação a 30 °C. A atividade de tirosinase (U) foi definida em termos de quantidade de enzima necessária para catalisar a oxidação de  $1 \text{ } \mu\text{mol}$  de L-DOPA/min, usando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) igual a  $3,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (ICHISHIMA et al., 1984).

#### **4.8.3 Atividade de lacase**

Para determinar a atividade de lacase foi utilizada metodologia descrita por Szlarz et al. (1989) com modificações. A atividade de lacase foi determinada a 30 °C na mistura reacional contendo 1,0 mL de tampão citrato-fosfato ( $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ ) pH 5,0; 0,6 mL de extrato enzimático e 0,4 mL de solução contendo siringaldazina. A solução de siringaldazina foi preparada adicionando 0,05g de siringaldazina em 50 mL de

etanol. Como controle negativo foi utilizado extrato enzimático fervido por 5 minutos a 100 °C.

A oxidação da siringaldazina foi medida pelo monitoramento do aumento da absorvância a 525 nm após 10 minutos de reação a 30 °C. A atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de siringaldazina/min, usando o coeficiente de extinção molar ( $\mathcal{E}$ ) igual a  $6,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (SZLARZ et al., 1989).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito do ácido glutâmico na produção de melanina pelo mutante MEL1 do fungo *A. nidulans*

Avaliando o efeito do ácido glutâmico na melanização do mutante MEL1 (Tabela 3), observa-se que a presença de nitrato de sódio + ácido glutâmico resultou em um aumento de 39% na produção do pigmento em comparação ao cultivo com nitrato de sódio (controle) e cerca de 88% quando comparado com ácido glutâmico.

Tabela 3 - Produção de biomassa, pigmento e melanina em resposta a diferentes condições de cultivo.

Condições de cultivo	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Pigmento (mg.g <sup>-1</sup> )	Melanina (mg.g <sup>-1</sup> )*
Nitrato de sódio	3,25 ± 0,03	224,92 ± 10,61	20,10 ± 0,89 <sup>a</sup>
Ácido Glutâmico	2,86 ± 0,01	167,23 ± 18,90	11,16 ± 1,36 <sup>b</sup>
Nitrato de sódio + Ácido Glutâmico	3,35 ± 0,01	313,76 ± 8,01	22,60 ± 1,26 <sup>a</sup>

\*Coeficientes iguais para coluna Melanina (mg.g<sup>-1</sup>) representam que não há diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, p < 0,05 complementado com Tukey).

Fonte: Autoria própria

Em relação à produção de melanina também foi observado o mesmo comportamento, sendo que na presença de nitrato de sódio + ácido glutâmico obteve-se um aumento de 12% em relação ao cultivo com nitrato de sódio e de 102% comparado ao ácido glutâmico, o qual apresentou o menor rendimento (11,16 ± 1,36 mg.g<sup>-1</sup>) comparado com as outras condições. Também pode ser observado na Tabela 3, que maior produção de biomassa ocorreu na presença de nitrato de sódio e nitrato de sódio + ácido glutâmico, enquanto que no cultivo com ácido glutâmico foi obtido um menor crescimento, sendo a redução de aproximadamente 15% comparada as demais condições.

A presença de nitrato de sódio + ácido glutâmico resultou em um pequeno aumento na produção de melanina pelo mutante MEL1. Este resultado pode ser explicado pela afirmação de Marzluf (1993), o qual reporta que, embora nitrato de sódio seja uma excelente fonte de nitrogênio para *A. nidulans*, amônia, glutamato e glutamina são fontes de nitrogênio preferenciais. Neste sentido, a adição de ácido glutâmico juntamente com nitrato de sódio pode ter sido vantajosa energeticamente

para o mutante MEL1. De acordo com Said et al. (2014), a disponibilidade de glutamato no meio de cultivo evita a necessidade de sua síntese a partir de amônia ou nitrato, uma vez que glutamato diretamente, ou após a conversão em glutamina, é utilizado para a biossíntese de vários metabólitos. Como também relatado por Silveira et al. (2008), a presença de ácido glutâmico resultou em um aumento da produção de pigmento em *Monascus purpureus*, porém somente em combinação com altas concentrações de peptona.

Estudos também mostraram que a relação entre carbono e nitrogênio influencia a produção de pigmentos em fungos (MAO et al., 2005). No presente estudo, foi verificado que a razão carbono / nitrogênio em cada condição de cultivo é diferente e provavelmente pode também explicar as diferenças na produção de melanina pelo mutante MEL1. Na condição nitrato de sódio (controle) a razão carbono / nitrogênio é de 4:1 (C/N) e para nitrato de sódio + ácido glutâmico é de 3,8:1 (C/N). Verifica-se que nessas duas condições de cultivo a razão carbono / nitrogênio foram muito próximas e a produção de melanina nessas condições também foram próximas (Tabela 3). Por outro lado, para ácido glutâmico a razão carbono / nitrogênio foi muito superior (49:1 C/N) e nesta condição o MEL1 apresentou a menor produção de melanina, sendo a redução de aproximadamente 50% comparado com as outras condições. Said et al. (2014) também observaram que a produção do pigmento vermelho em *Monascus ruber* foi reduzida em altas proporções carbono / nitrogênio.

Neste sentido, o ácido glutâmico foi considerado como um dos fatores do planejamento experimental para otimização da produção de melanina pelo MEL1, mantendo o nitrato de sódio como principal fonte de nitrogênio (70 mmol.L<sup>-1</sup>). Desta forma, será possível determinar a concentração ótima do ácido glutâmico em combinação com o nitrato de sódio visando potencializar a produção de melanina pelo mutante MEL1.

## 5.2 Planejamento experimental – DCCR

Na Tabela 4 é mostrado a produção de melanina por grama de biomassa como resposta aos níveis estudados para cada fator do DCCR. Observa-se uma grande variação na resposta (melanina  $\text{mg.g}^{-1}$ ) entre os ensaios, variando de 14,266 a 125,267 $\text{mg.g}^{-1}$  de biomassa. A variação na resposta pode ser observada na Figura 14, onde é possível verificar significativa diferença na coloração e na produção de melanina. Esta variação na produção de melanina exibida pelo MEL1 indica que a escolha dos fatores e seus níveis estudados foram acertados, sendo que os fatores selecionados para o DCCR desempenham função importante na produção de melanina pelo MEL1, visto a amplitude de variação na resposta entre os ensaios.

Tabela 4 - Matriz de ensaios do DCCR 2<sup>5</sup> para resposta a produção de melanina por grama de biomassa pelo mutante MEL1. Os valores codificados estão entre parênteses.

(Continua)

Ensaio	L-tirosina ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )	Glicose % (v/v)	Ác. Glutâmico ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )	L-DOPA ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )	Sulfato de cobre ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	Melanina ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
1	1,4 (-1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)	56,832
2	3,4 (+1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)	58,755
3	1,4 (-1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)	38,771
4	3,4 (+1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)	32,218
5	1,4 (-1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)	48,704
6	3,4 (+1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)	60,044
7	1,4 (-1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)	37,603
8	3,4 (+1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	7,5 (-1)	28,043
9	1,4 (-1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)	125,267
10	3,4 (+1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)	63,841
11	1,4 (-1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)	91,267
12	3,4 (+1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)	57,005
13	1,4 (-1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)	115,757
14	3,4 (+1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)	91,309
15	1,4 (-1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)	104,646
16	3,4 (+1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	7,5 (-1)	110,355

Fonte: Autoria própria

Tabela 4 - Matriz de ensaios do DCCR 25 para resposta a produção de melanina por grama de biomassa pelo mutante MEL1. Os valores codificados estão entre parênteses.

(Continua)

Ensaio	L-tirosina (mmol.L <sup>-1</sup> )	Glicose % (v/v)	Ác. Glutâmico (mmol.L <sup>-1</sup> )	L-DOPA (mmol.L <sup>-1</sup> )	Sulfato de cobre (µmol.L <sup>-1</sup> )	Melanina (mg.g <sup>-1</sup> )
17	1,4 (-1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	18 (+1)	45,948
18	3,4 (+1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	19 (+1)	89,603
19	1,4 (-1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	20 (+1)	37,776
20	3,4 (+1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	1,4 (-1)	21 (+1)	24,962
21	1,4 (-1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	22 (+1)	57,741
22	3,4 (+1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	23 (+1)	53,941
23	1,4 (-1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	24 (+1)	22,534
24	3,4 (+1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	1,4 (-1)	25 (+1)	27,003
25	1,4 (-1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	26 (+1)	103,018
26	3,4 (+1)	0,8 (-1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	27 (+1)	98,555
27	1,4 (-1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	28 (+1)	66,071
28	3,4 (+1)	1,8 (+1)	3,5 (-1)	3,4 (+1)	29 (+1)	45,563
29	1,4 (-1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	30 (+1)	70,810
30	3,4 (+1)	0,8 (-1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	31 (+1)	61,692
31	1,4 (-1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	32 (+1)	33,840
32	3,4 (+1)	1,8 (+1)	7,5 (+1)	3,4 (+1)	33 (+1)	81,784
33	0,02 (-2,38)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)	33,694
34	4,78 (+2,38)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)	47,708
35	2,4 (0)	0,11 (-2,38)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)	78,860
36	2,4 (0)	2,49 (+2,38)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)	29,821
37	2,4 (0)	1,3 (0)	0,74 (-2,38)	2,4 (0)	12,75 (0)	26,691
38	2,4 (0)	1,3 (0)	10,26 (+2,38)	2,4 (0)	12,75 (0)	51,922
39	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	0,02 (-2,38)	12,75 (0)	14,266
40	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	6,85 (+2,38)	12,75 (0)	78,688

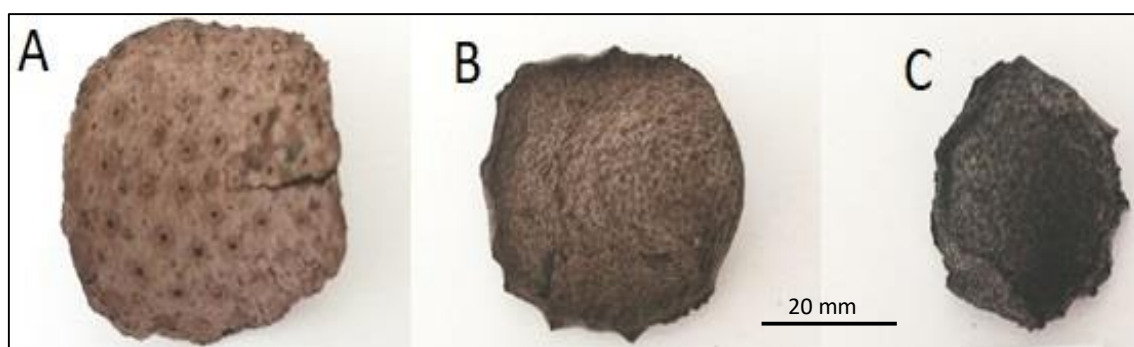
Fonte: Autoria própria

Tabela 4 - Matriz de ensaios do DCCR 25 para resposta a produção de melanina por grama de biomassa pelo mutante MEL1. Os valores codificados estão entre parênteses.

Ensaio	L-tirosina (mmol.L <sup>-1</sup> )	Glicose % (v/v)	Ác. Glutâmico (mmol.L <sup>-1</sup> )	L-DOPA (mmol.L <sup>-1</sup> )	Sulfato de cobre (µmol.L <sup>-1</sup> )	(Conclusão)
						Melanina (mg.g <sup>-1</sup> )
41	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	0,27 (-2,38)	52,806
42	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	25,23 (+2,38)	43,573
43	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)	70,588
44	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)	84,072
45	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)	66,512
46	2,4 (0)	1,3 (0)	5,5 (0)	2,4 (0)	12,75 (0)	79,893

Fonte própria

Figura 14 - Coloração da biomassa em função da produção de melanina em diferentes ensaios do DCCR (Tabela 4): A - refere-se ao ensaio 8, cuja produção de melanina foi de 28,043 mg.g<sup>-1</sup>; B - refere-se ao ensaio 17, cuja produção de melanina foi de 45,948 mg.g<sup>-1</sup> e C - refere-se ao ensaio 9, cuja produção de melanina foi de 125 mg.g<sup>-1</sup>.



Fonte própria.

O efeito de cada fator na variável resposta pode ser observado na Tabela 5. Dentre os fatores com efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) para a produção de melanina, L-DOPA foi o único que apresentou efeito positivo. Neste sentido, variando a concentração de L-DOPA do nível inferior -1 (1,4 mmol.L<sup>-1</sup>) para o nível superior +1 (3,4 mmol.L<sup>-1</sup>) resulta em um aumento na produção de melanina na ordem de 36,31 mg de melanina.g<sup>-1</sup> de biomassa (Tabela 5). Por outro lado, todos os outros fatores apresentaram efeitos negativos na produção de melanina.

Tabela 5 - Efeito dos fatores na produção de melanina (mg.g<sup>-1</sup>).

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

\* L para termos lineares e Q para termos quadráticos

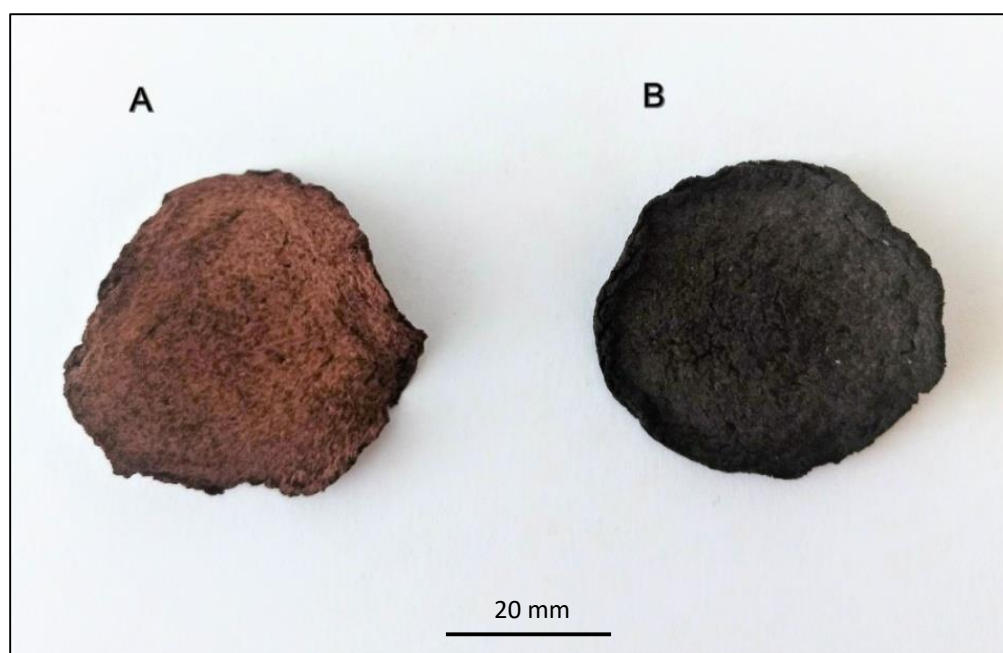
\*\*Nível de significância 95% (p < 0,05).

Fonte: Autoria própria

As análises estatísticas dos efeitos apresentada na Tabela 5 confirma os resultados observados nos ensaios (Tabela 4). Por exemplo, comparando os ensaios

35 e 36, onde todos os fatores estão fixados em seus pontos médios e apenas o fator glicose varia do seu ponto axial inferior (-2,38, ensaio 35) para seu ponto axial superior (+2,38, ensaio 36), observa-se que esta alteração resultou na variação da resposta de 78,86 para 29,82 mg de melanina.g<sup>-1</sup> de biomassa. Isto indica que aumentando a concentração de glicose disponível no meio de cultura ocorre uma diminuição da produção de melanina (mg.g<sup>-1</sup> biomassa) pelo MEL1. A análise estatística dos efeitos dos fatores sobre a resposta (Tabela 5) confirmou essa observação, pois a glicose apresentou um efeito negativo sobre a produção de melanina. A mesma comparação pode ser feita para os outros fatores. Por exemplo nos ensaios 39 e 40, todos os fatores estão fixados em seus pontos médios, variando apenas a concentração do L-DOPA do ponto axial inferior (0,02 mmol.L<sup>-1</sup>) para seu ponto axial superior (6,85 mmol.L<sup>-1</sup>), neste caso a produção de melanina variou de 14,26 para 78,68 (mg.g<sup>-1</sup> biomassa), o que indica um efeito positivo do L-DOPA, como mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Melanização do MEL1 em função da variação da concentração de L-DOPA no meio de cultivo. Em A - 0,02 mmol.L<sup>-1</sup> de L-DOPA e B - 6,85 mmol.L<sup>-1</sup> de L-DOPA com produção de 14,266 e 78,688 mg de melanina por grama de biomassa, respectivamente.



Fonte: Autoria própria

Com os resultados do DCCR foi possível determinar os coeficientes de regressão para a resposta produção de melanina.g<sup>-1</sup> de biomassa, levando a

proposição de um modelo matemático, representado pela equação  $Y$  (mg de melanina.g<sup>-1</sup> de biomassa):

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

Onde:  $x_1$  = L-tirosina

$x_2$  = Glicose

$x_3$  = Ácido glutâmico

$x_4$  = L-DOPA

$x_5$  = Sulfato de cobre

Pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 6, observa-se que o modelo proposto que descreve a resposta de  $Y$  em função dos fatores estudados é adequado, visto que  $F$  calculado foi significativo ( $p < 0,05$ ). Desta forma, o modelo matemático representa nossos dados e, de acordo com Rodrigues e lemma (2005), satisfaz os requisitos para a construção das superfícies respostas e curvas de contorno. Além disso, pela análise de distribuição  $F$ , verifica-se que a falta de ajuste não foi significativa ( $p > 0,05$ ), ou seja, o modelo não apresenta falta de ajuste.

Tabela 6 - Análise de variância para regressão dos fatores em função da produção de melanina (mg.g<sup>-1</sup> biomassa) pelo MEL1 – *Aspergillus nidulans*.

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

$R^2 = 79,76\%$

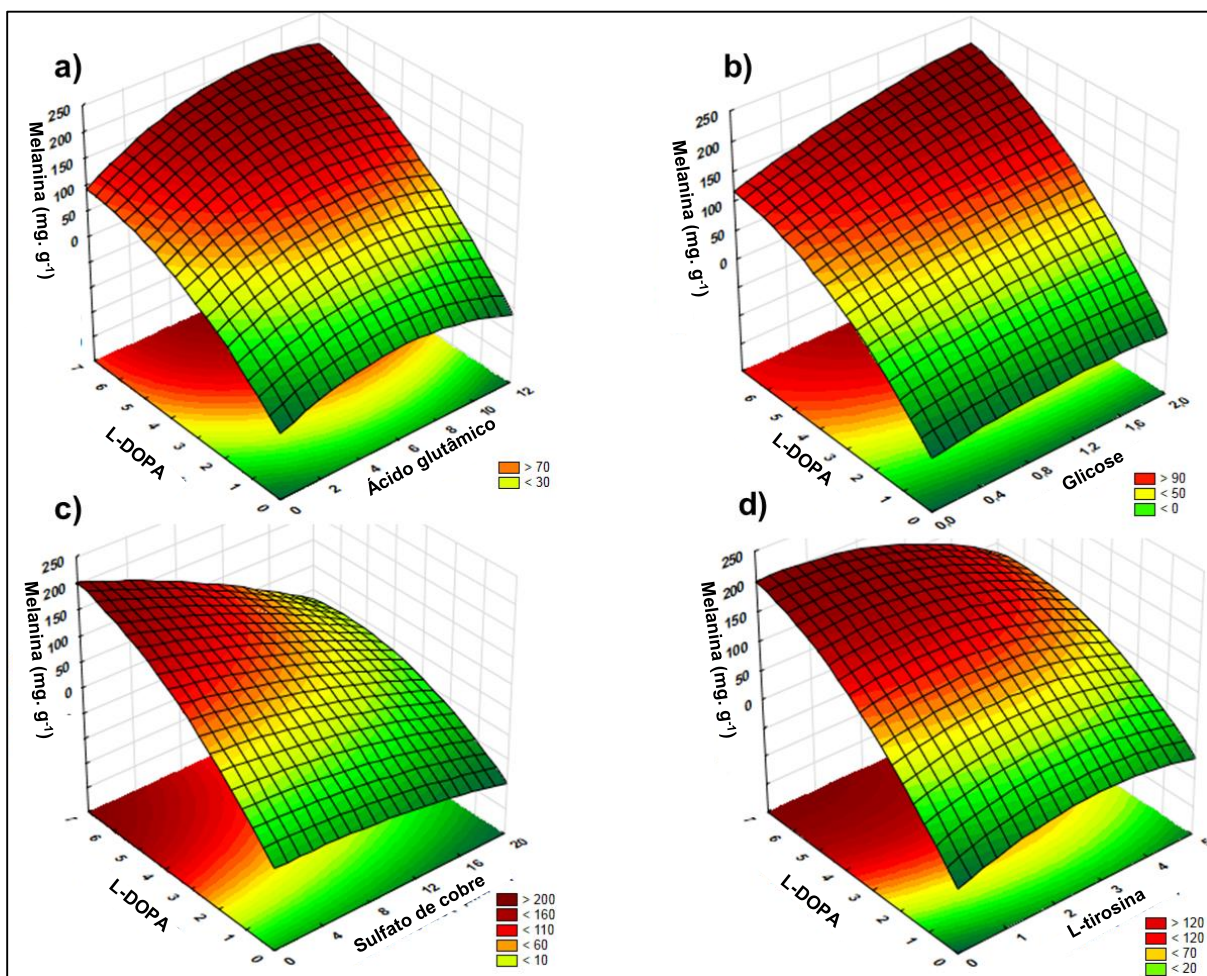
\*Nível de significância 95% ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autoria própria

Validado o modelo matemático, foram construídas as superfícies de respostas (Figura 16). Em todos os gráficos foi considerada como resposta a produção de

melanina ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  biomassa) em função das concentrações de L-DOPA versus os outros fatores. A escolha de L-DOPA foi devido ao fato de L-DOPA ter apresentado maior efeito significativo para a resposta produção de melanina.

Figura 16 - Superfícies de respostas para a produção de melanina ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  biomassa) pelo mutante MEL1 em função dos fatores: a) L-DOPA versus ácido glutâmico; b) L-DOPA versus Glicose; c) L-DOPA versus Sulfato de cobre e d) L-DOPA versus L-tirosina.



Fonte: Autoria própria

Pela análise das superfícies de respostas (Figura 16) é possível observar que a maior produção de melanina ocorreu sempre nas maiores concentrações de L-DOPA, independentemente da combinação com os outros fatores. Estes resultados indicam que o L-DOPA tem um papel de indutor da melanização para a linhagem MEL1, provavelmente devido ao fato da melanina produzida por este mutante ter sido caracterizada como DOPA-melanina (GONÇALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2012). Neste sentido, suplementar o meio de cultivo do MEL1 com L-DOPA forneceu

o substrato para biossíntese da DOPA-melanina neste fungo. A síntese deste pigmento ocorre por oxidação do L-DOPA, pela ação das enzimas tirosinase ou lacase, diretamente a dopaquinona, a qual é polimerizada espontaneamente para formar DOPA-melanina (LANGFELDER et al., 2003). Outros estudos também relataram o efeito do L-DOPA na produção do pigmento melanina, Almeida-Paes et al. (2009) demonstraram que algumas linhagens de *Sporothrix schenckii* foram incapazes de apresentar melanização na ausência de L-DOPA, demonstrando a importância de L-DOPA na biossíntese da melanina nas linhagens estudadas. Eisenman et al. (2011) também observaram o efeito positivo de L-DOPA na melanização de *Cryptococcus neoformans*. Os autores demonstraram que para melanização em *C. neoformans* ocorrer requer a adição exógena de substrato para biossíntese da melanina, sendo L-DOPA o substrato preferencial.

Outro precursor da via de biossíntese da melanina frequentemente reportado como indutor da melanização em diversos fungos é a L-tirosina (GASPARETTI et al., 2012; ZOU et al., 2016). Sun et al. (2016) relataram que a produção de melanina por *Auricularia auricula* exibiu uma correlação positiva na concentração de L-tirosina no meio de cultivo e a produção de melanina. Outro estudo também demonstrou que a produção de melanina por *A. auricula* é aumentada com a suplementação do meio de cultivo com L-tirosina (ZOU et al., 2016). No entanto, com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível verificar que L-tirosina é requerida em baixas concentrações quando em combinação com L-DOPA (Figura 16d). Uma possível explicação deve-se ao fato de que quando L-tirosina e L-DOPA (precursores da melanina) estão disponíveis para biossíntese do pigmento, o mutante MEL1 utiliza preferencialmente o L-DOPA para biossíntese da melanina. Na Tabela 4, comparando os ensaios 33 e 34, observa-se que a concentração de L-tirosina variou de 0,02 mmol.L<sup>-1</sup> (ponto axial inferior) para 4,78 mmol.L<sup>-1</sup> (ponto axial superior), resultando um aumento de 1,4 vezes na melanização do mutante MEL1, cujo a produção de melanina variou de 33,69 para 47,70 mg de melanina.g<sup>-1</sup> biomassa. Por outro lado, nos ensaios 39 e 40, onde a variação da concentração de L-DOPA foi de 0,02 mmol.L<sup>-1</sup> (ponto axial inferior) para 6,85 mmol.L<sup>-1</sup> (ponto axial superior), obteve-se um aumento de 5,5 vezes na produção de melanina pelo MEL1, aumentando de 14,26 para 78,68 mg de melanina.g<sup>-1</sup> biomassa. Estes resultados indicam que o L-DOPA pode ser considerado

o precursor preferencial para produção de melanina pelo mutante MEL1 em comparação com L-tirosina.

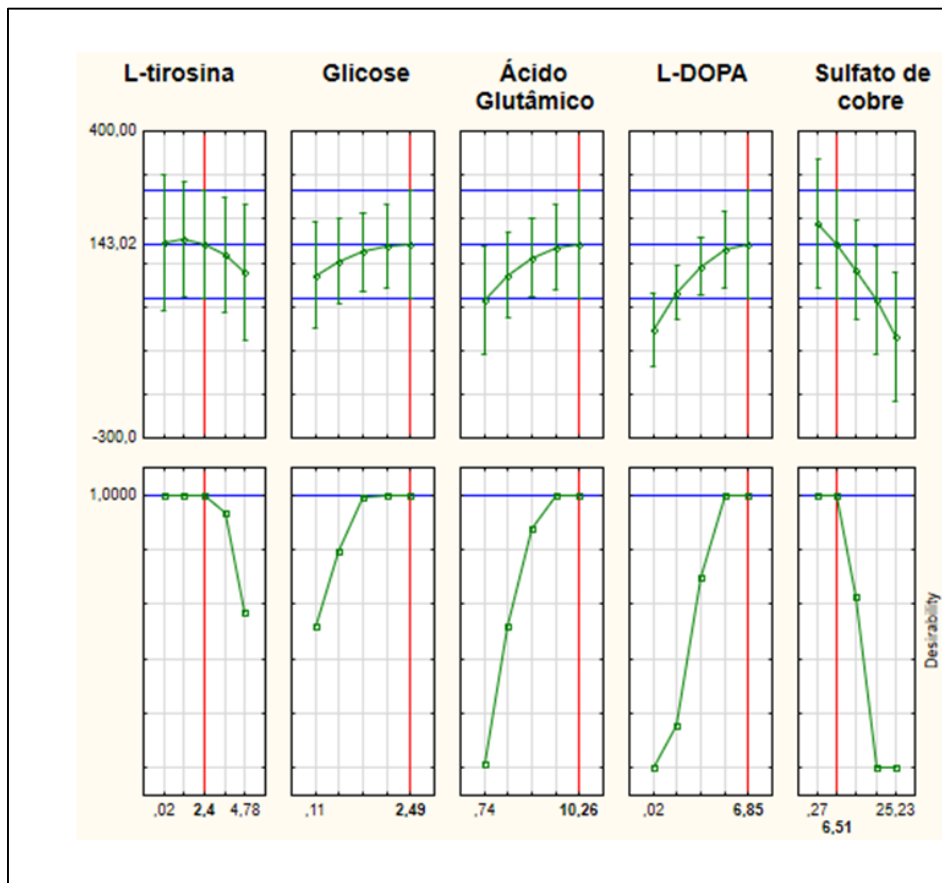
Na interação de L-DOPA com glicose, observa-se que a maior produção de melanina em alta concentração de L-DOPA somente ocorreu quando glicose também estava presente em altas concentrações (Figura 16b). De acordo com a literatura, a fonte de carbono e sua concentração no meio de cultivo podem afetar diretamente a biossíntese de metabólitos secundários em fungos (GRIFFIN, 1993), incluindo a produção de melanina. Por exemplo, Sun et al. (2016), estudando o efeito de nutrientes no meio de cultivo para melanização em *A. auricula*, reportou que a concentração de glicose afeta tanto o crescimento micelial quanto a síntese de melanina, pois fornece carbono não só para as necessidades energéticas de manutenção das atividades celulares como também para biossíntese de melanina em *A. auricula*. Neste sentido, os resultados da Figura 16b também podem ser explicados pelo fato que a maior produção de melanina obtida na presença de altas concentrações de L-DOPA requer muita energia química, a qual é fornecida quando a glicose está presente em altas concentrações. O mesmo pode ser observado para interação de ácido glutâmico e L-DOPA. Na Figura 16a, verifica-se que ácido glutâmico também deve estar presente em altas concentrações para obter uma maior produção de melanina em altas concentrações de L-DOPA. Como mencionado anteriormente, a presença do ácido glutâmico no meio de cultivo pode representar uma vantagem energética, pois o glutamato pode ser diretamente utilizado para biossíntese de vários metabólitos sem a necessidade de sua síntese a partir de amônia ou nitrato (SAID et al., 2014).

De acordo com a Figura 15C, a maior produção de melanina obtida em altas concentrações de L-DOPA requer baixa concentração de sulfato de cobre. Embora o sulfato de cobre seja amplamente conhecido como indutor da tirosinase e lacase, enzimas responsáveis pela melanização em fungos (LANGFELDER et al., 2003) e estudos demonstrarem que a melanização de *Trametes pubescens* ocorre em resposta a concentrações crescentes de íon de cobre (GALHAUP; HALTRICH, 2001), os resultados do presente estudo indicam que a presença de sulfato de cobre no meio de cultivo não influencia positivamente a melanização do MEL1 e é requerido em baixas concentrações.

### 5.3 Validação do modelo

Para validação experimental do modelo foi utilizado a função de desejabilidade, a qual calcula o valor máximo para a variável resposta em função da combinação dos fatores em seus níveis ótimos. Como observa-se na Figura 17, o valor predito pelo modelo para maior produção de melanina é de 143,02 mg de melanina.g<sup>-1</sup> de biomassa. Por meio desta função, também é possível estabelecer o melhor nível de cada fator visando menor custo no processo. Por exemplo, o fator L-tirosina foi estabelecido pela função de desejabilidade em seu nível central (2,4 mmol.L<sup>-1</sup>), entretanto, observando o fator L-tirosina (Figura 17), verifica-se que é possível optar por utilizar a menor concentração de L-tirosina (0,02 mmol.L<sup>-1</sup>) sem afetar de forma significativa o valor predito pelo modelo. Desta forma, com o objetivo de reduzir os custos do processo, estabeleceu-se as seguintes concentrações para cada fator para validação experimental do modelo: L-tirosina 0,02 mmol.L<sup>-1</sup>; Glicose 1,8% (v/v); Ácido glutâmico 10,26 mmol.L<sup>-1</sup>; L-DOPA 6,85 mmol.L<sup>-1</sup> e Sulfato de cobre 0,27 µmol.L<sup>-1</sup>.

Figura 17 - Função de desejabilidade para a variável resposta produção de melanina em função da combinação dos valores ótimos de cada fator.



Fonte: Autoria própria

Na tabela 7 verifica-se que a produção de melanina obtida no ensaio de validação, utilizando as condições estabelecidas, foi de  $145,11 \pm 11,24$  mg.g<sup>-1</sup> de biomassa, sendo a diferença de apenas 1,44% comparado com o valor predito pelo modelo (143,02 mg de melanina.g<sup>-1</sup> de biomassa), indicando que não há diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,1$ ) entre os valores obtido e predito pelo modelo, portanto, o modelo proposto foi validado experimentalmente.

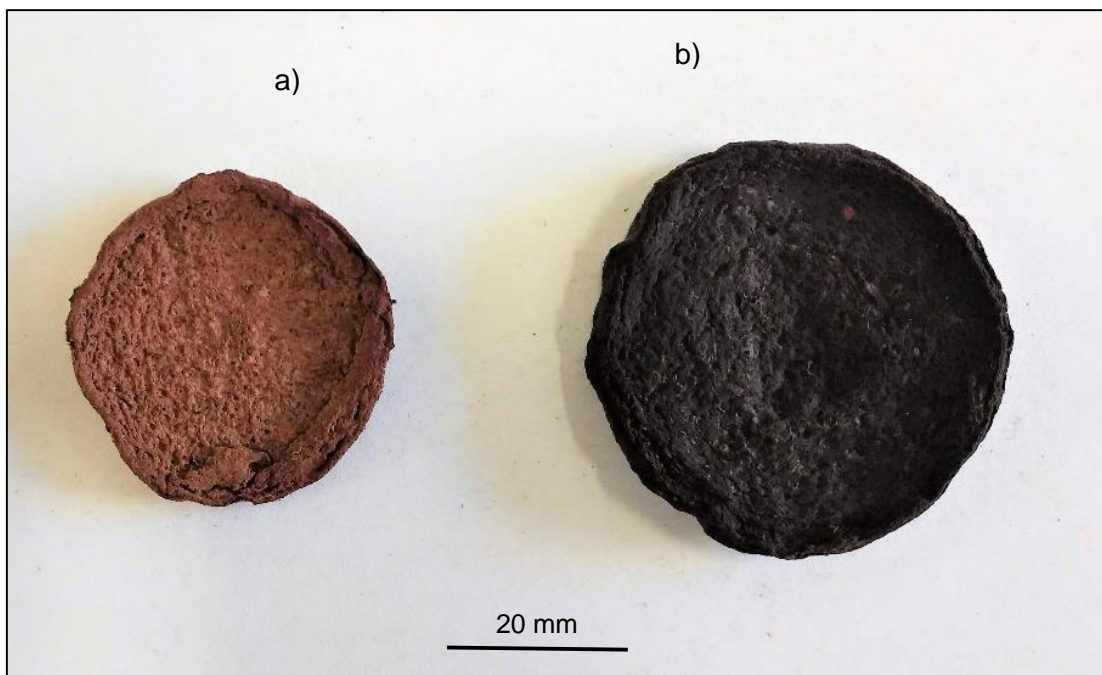
Tabela 7 - Produção de melanina pelo MEL1 na condição otimizada para validação do modelo proposto.

	Melanina (mg.g <sup>-1</sup> )
Predito pelo modelo	143,02
Obtido experimentalmente	$145,11 \pm 11,24$

Fonte: Autoria própria

Uma vez estabelecida as condições ótimas para produção da melanina pelo mutante MEL1 é possível compará-la com a condição antes da otimização (controle). Nesta condição, a produção de melanina foi de  $19,69 \pm 3,16$ , enquanto que, após a otimização, atingiu valores de  $145,11 \pm 11,24$  mg de melanina por grama de biomassa. Essa diferença de melanização do MEL1 pode ser observada na Figura 18. Portanto, com a otimização dos fatores analisados (L-Dopa, L-tirosina, ácido glutâmico, glicose e sulfato de cobre) foi obtido um aumento de aproximadamente 640% na produção de melanina pelo mutante MEL1.

Figura 18 - Melanização da biomassa do MEL1 nas condições controle (a) e otimizada (b).

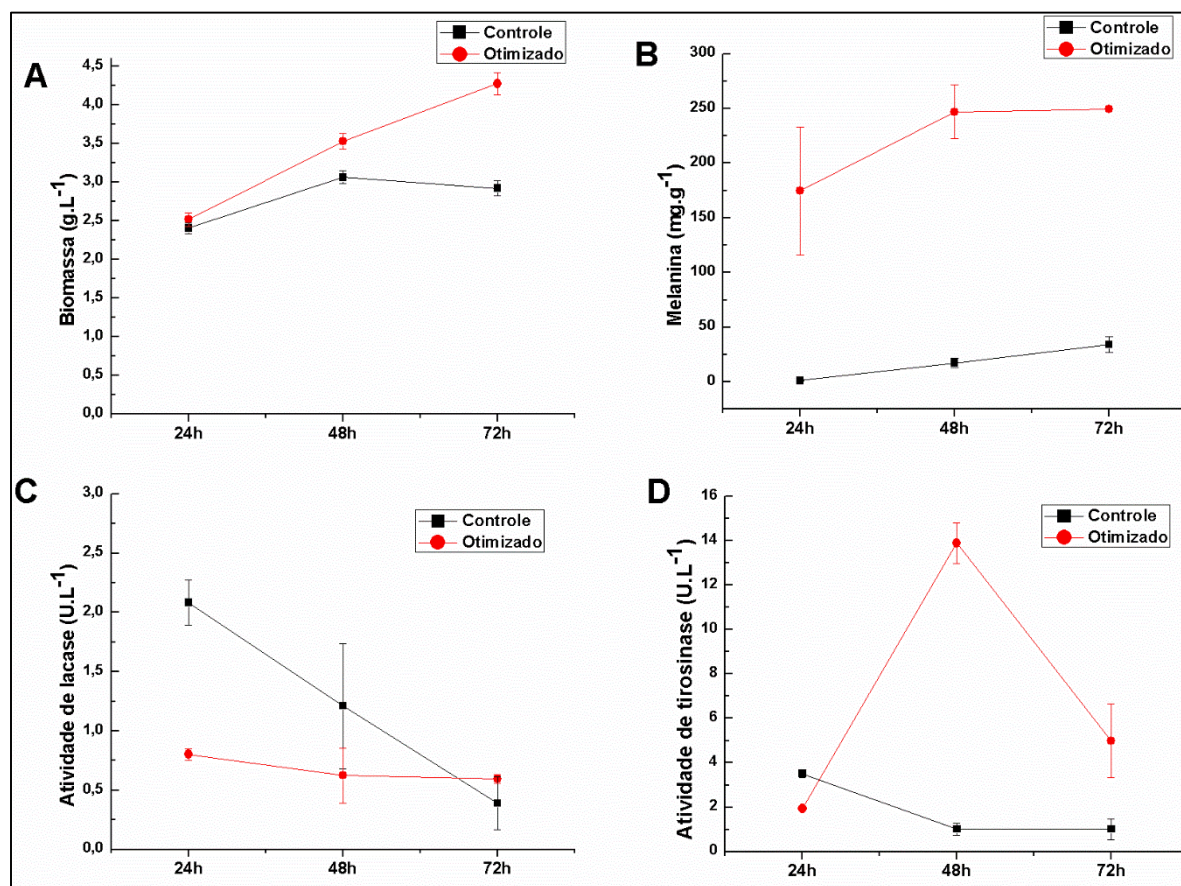


Fonte: Autoria própria

#### 5.4 Atividade enzimática de lacase e tirosinase pelo MEL1

Com o objetivo de avaliar a existência de relação entre a melanização do MEL1 e a atividade das enzimas tirosinase e lacase envolvidas na biossíntese da DOPA-melanina, foi realizado o cultivo do mutante MEL1 nas condições controle e otimizada por 24h, 48h e 72h na etapa da cultura (Figura 19).

Figura 19 - Crescimento, produção de melanina e atividade enzimática do MEL1 após crescimento nas condições controle e otimizada. A – produção de biomassa; B – produção de melanina; C – atividade de lacase e D - atividade de tirosinase.



Fonte: Autoria própria

Na figura 19A, observa-se que na condição controle (antes da otimização) o MEL1 atingiu a fase estacionária de crescimento a partir de 48h da cultura. Por outro lado, na condição otimizada não foi observada a fase estacionária até 72 h na etapa da cultura, ou seja, o MEL1 permanece em fase exponencial de crescimento durante todo o período da cultura. Este comportamento exibido pelo MEL1 pode ser devido a maior disponibilidade de alguns nutrientes na condição otimizada, principalmente a alta concentração de glicose como fonte de carbono (1,8%), o que favorece o crescimento vegetativo do fungo. De acordo com a literatura, a fonte de carbono e sua concentração afetam diretamente o metabolismo dos micro-organismos, levando a alterações metabólicas, como a expressão de enzimas (GRIFFIN, 1993; HERNANDEZ et al., 2015). Em relação a produção do pigmento melanina, é possível observar na Figura 19B que em apenas 24h da cultura na condição otimizada verifica-

se um maior grau de melanização do MEL1 comparado a condição controle. Como mencionado anteriormente, a melanina é formada pela oxidação de fenóis ou indóis por ação das enzimas tirosinases e lacases, sendo que a origem dos precursores da melanina pode ser endógena ou exógena. Na condição controle, a melanização ocorreu em resposta ao metabolismo do MEL1, sem a suplementação exógena dos precursores da melanina. Por outro lado, na condição otimizada observa-se um maior grau de melanização do MEL1 provavelmente devido a presença dos precursores da síntese de melanina, como L-tirosina e L-DOPA, no meio de cultura.

Na Figura 19C é possível notar uma grande diferença na atividade da enzima lacase entre as condições testadas nos diferentes tempos de cultura. Após 24h da cultura, a atividade de lacase foi cerca de 2 vezes maior na condição controle comparado à condição otimizada. Entretanto, nos tempos de 48h e 72h da cultura, não há diferenças estatisticamente significativas entre as atividades enzimáticas nas condições testadas. Também observa-se um comportamento diferente desta enzima durante todo o tempo da cultura, sendo que na condição controle ocorreu um declínio da atividade de lacase, enquanto que na condição otimizada a atividade enzimática foi mantida constante. A diferença na atividade da lacase entre as condições controle e otimizada pode estar relacionada a expressão dos genes *yA* e *tilA*, que codificam lacases em *A. nidulans*. Clutterbuck (1972) demonstrou que a expressão do gene *yA*, que codifica lacase em *A. nidulans*, é regulada pelo desenvolvimento do fungo, ocorrendo somente antes do início da fase de conidiação, pelo fato deste gene codificar a lacase responsável pela pigmentação verde dos conídios. Scherer e Fischer (2001) identificaram outro gene (*tilA*) que também codifica lacase em *A. nidulans*, sendo que a sua expressão acontece durante a fase exponencial de crescimento e mantêm-se praticamente inalterada durante todo o crescimento assexuado. Segundo Scherer e Fischer (2001), esse gene tem outro papel durante o crescimento do fungo, provavelmente participando no processo de melanização das hifas em estágios anteriores a conidiação.

Considerando essas informações sobre a expressão dos genes *yA* e *tilA* em *A. nidulans*, a maior atividade lacase na condição controle obtida em 24h pode ser devido a expressão simultânea de ambos os genes uma vez que o MEL1 está no final da fase exponencial de crescimento (Figura 19A) a qual se caracteriza pelo início da produção de esporos. No entanto, nos tempos de 48 e 72h na condição controle, o declínio na

atividade da lacase provavelmente ocorreu pela expressão somente do gene *yA*, responsável pela pigmentação dos esporos. Neste período, o MEL1 está na fase estacionária de crescimento e, provavelmente não houve expressão do gene *tilA*. Por outro lado, em todos os tempos estudados (24, 48 e 72h) na condição otimizada observa-se que o MEL1 está na fase exponencial, ou seja, com predomínio do crescimento micelial, sendo que nesta fase não seria esperado a expressão do gene *yA*, mas apenas o *tilA* estaria sendo expresso e, por este motivo, a atividade da lacase permanece praticamente constante (Figura 19C). Esses resultados concordam com os relatos de Clutterbuck (1972) e Scherer e Fischer (2001) sobre a expressão dos genes *yA* e *tilA* durante a fase de crescimento exponencial. Neste contexto, estes resultados mostram que a atividade de lacase não foi aumentada / induzida pela presença dos substratos L-tirosina e L-DOPA na condição otimizada e, portanto, o aumento da melanização do MEL1 nesta condição, observada na Figura 20B, não pode ser explicada pela atividade da lacase, que se manteve em baixa atividade durante todo período de cultura.

Em relação a enzima tirosinase, no tempo de 24h na condição controle, a atividade enzimática apresentou um pequeno aumento (cerca de 1 vez) em comparação a condição otimizada (Figura 19D). Em seguida, a atividade de tirosinase diminuiu cerca de 3 vezes, mantendo-se em níveis baixos até o final do período da cultura. Estudos têm mostrado que a atividade tirosinase está relacionada a fase de crescimento do fungo. Carter e Bull (1969) demonstraram que a atividade de tirosinase em *A. nidulans* alcança níveis máximos durante a fase de crescimento exponencial, apresentando uma redução na fase estacionária. Comportamento semelhante foi observado com o MEL1 na condição controle, que em 24h obtem-se maior atividade de tirosinase, sendo que o crescimento está em fase exponencial (Figura 19A) e nos tempos de 48 e 72h, o MEL1 está na fase estacionária e em resposta, a atividade de tirosina se mantém em níveis baixos (Figura 19D). Comparando com a condição otimizada, no tempo em 48h a tirosinase apresentou um pico de atividade enzimática, cerca de 13 vezes maior que a atividade obtida na condição controle para o mesmo tempo (Figura 19D). O aumento na atividade de tirosinase exibida pelo MEL1 em 48h na condição otimizada pode ser explicada pela presença de L-tirosina, ou seja, a produção de tirosinase foi induzida pela presença do substrato dessa enzima. Outros estudos também mostraram resultados semelhantes. Duarte et al. (2012),

demonstraram que para expressão de tirosinase em linhagens de *Pycnoporus sanguineus* foi necessária a suplementação do meio de cultivo com 0,15% de L-tirosina. Agarwal et al. (2016) observaram que a atividade tirosinase em *Aspergillus niger* foi significativamente aumentada quando o meio de cultivo foi suplementado com 5 mg.mL<sup>-1</sup> de L-tirosina. Zou et al. (2016) também observaram que a adição de 1,59 g.L<sup>-1</sup> de L-tirosina no meio aumentou a atividade de tirosinase, o que resultou e maior produção de melanina em *A. auricula*.

Para explicar esses resultados deve-se considerar que a tirosinase apresenta 4 estados diferentes: met-tirosinase, deoxi-tirosinase, oxi-tirosinase e deact-tirosinase (Figura 7). O estado nativo da enzima tirosinase é a met-tirosinase, neste estado a enzima consegue interagir com monofenóis, mas não acontece reação catalítica. O estado met da tirosinase é um estado não ativo da enzima, para ativação é necessário a presença de um difenol. Quando um difenol se liga ao sítio ativo da met-tirosinase acontece a redução da enzima para o estado deoxi-tirosinase e neste estado a enzima consegue ligar-se a um oxigênio molecular para finalmente chegar ao seu estado oxi-tirosinase. A oxi-tirosinase é o estado ativo da enzima, que pode oxidar fenóis em seus correspondentes o-quinonas tanto por seu mecanismo de oxidação monofenoloxidase quanto por seu mecanismo de difenoloxidase (RAMSDEN; RILEY, 2014). Neste sentido, a presença do L-DOPA (difenol) na condição otimizada serviu como substrato necessário para ativação da enzima tirosinase. Como consequência, com maior atividade de tirosinase e presença dos substratos L-tirosina e L-DOPA, resultou em aumento (cerca de 640%) na melanização do MEL1 na condição otimizada. Estes resultados sugerem que a tirosinase é a principal enzima responsável pela melanização do mutante MEL1.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu chegar as seguintes conclusões:

1. A combinação de ácido glutâmico e nitrato de sódio promoveu um aumento na produção do pigmento melanina pelo mutante MEL1 do fungo *A. nidulans*.
2. Com o planejamento experimental DCCR foi possível otimizar a produção de melanina pelo MEL1, estabelecendo as concentrações ótimas dos fatores estudados (0,02 mmol.L<sup>-1</sup> de L-tirosina; 1,8% de glicose; 10,26 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido glutâmico; 6,85 mmol.L<sup>-1</sup> de L-DOPA e 0,27 µmol.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre).
3. Na condição otimizada ocorreu um aumento de 640% na melanização do mutante MEL1 comparado a condição antes da otimização.
4. O L-DOPA pode ser considerado o substrato preferencial para melanização do MEL1.
5. Tirosinase é a principal enzima responsável pela biossíntese do pigmento melanina no mutante MEL1.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo maximizaram a produção de melanina pelo mutante MEL1 do fungo *A. nidulans*, bem como, contribuiu para o avanço da compreensão de seu metabolismo.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, P. et al. *Aspergillus niger* PA2: a novel strain for extracellular biotransformation of L-tyrosine into L-DOPA. **Amino Acids**, v. 48, p. 1253-1262, 2016.
- AGRAWAL, K. et al. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. **Bioresour. Bioprocess.** p. 5:4, 2018.
- AMBRICO, M. et al. Melanin layer on silicone: na attractive structure for a possible exploitation in bio-polymer based metal-insulator-silicon devices. **Advanced Materials**, v. 23, p. 3332-3336, 2011.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes And Infection**, v. 11, p. 554-562, 2009.
- ARAUJO, M. et al. Natural melanina: A potencial pH-responsive drug release device. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 469, p. 140-145, 2014.
- ARULDASS, C. A.; DUFOSSÉ, L.; AHMAD, W. A. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p.168-182, 2018.
- BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, p.78-91, 2003.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS microbiol rev.** v. 30, n. 2, p 215-242, 2006.
- BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Ann. Rev. Phytopathol**, v. 24, p. 411-51, 1986.
- BETTINGER, C. J. et al. Biocompatibility of biodegradable semiconducting melanin films for nerve tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 3050-3057, 2009.

BRIDGE P.D., KOKUBUN T., SIMMONDS M.S.J. Protein Extraction From Fungi. In: CUTLER P. (ed.) **Protein Purification Protocols**. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2004. Chap. 5, p. 37-46. (Methods in molecular biology, v. 244).

BULL, A. Inhibition of polysaccharases by melanin: Enzyme inhibition in relation to mycolysis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 137, p. 345-356, 1970.

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

CARTER, B. L. A.; BULL, A. T. Studies of fungal growth and intermediary carbon metabolism under steady and non-steady state conditions. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 9, p. 785-804, 1969.

CHAURASIA, P. K. et al. A review on mechanism of laccase action. **RRBS**, v. 7, n. 2, 2013.

CHEN, S. et al. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Fems Microbiology Letters**, v. 29, p.143-148, 2002.

CLUTTERBUCK, A. J. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 70, p. 423-435, 1972.

CORDERO, R. J. B.; CASADEVALL, A. Functions of fungal melanin beyond virulence. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 2, p.99-112, 2016.

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

D'ISCHIA, M. et al. Melanins and melanogenesis: From pigment cells to human health and technological applications. **Pigment cell Melanoma Res.** v. 28, p. 520-544, 2015.

DUARTE, L. T. et al. Production And Characterization Of Tyrosinase Activity In *Pycnoporus Sanguineus* CCT- 4518 Crude Extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.21-29, 2012.

DUFOSSÉ, L. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry. **Journal of Food Composition And Analysis**, v. 69, p.156-161, 2017.

EISENMAN, H. C. et al. The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. **Journal Virulence**, vol. 2. p. 329-336, 2011.

EISENMAN, H. C., et al. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. **Microbiology**, v. 153, p. 3954-3962, 2007.

ELLIS, D. H.: GRIFFITHS, D. A. The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. **Can. J. microbial.** v. 20, 1974.

FERNANDEZ, C. W.; KOIDE, R. T., The function of melanina in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. **Fungal Ecology**, v.6, p. 479-486, 2013.

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

FOWLER, Z. L., et al. Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases. **Yeast**, p. 181-188, 2011.

GADD, G. M.; ROME, L. Biosorption of copper by fungal melanin. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 29, 1988.

GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 56, p. 225-232, 2001.

GASPARETTI, C. et al. Extracellular tyrosinase from the fungus *Trichoderma reesei* shows product inhibition and different inhibition mechanism from the intracellular tyrosinase from *Agaricus bisporus*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins And Proteomics**, v. 1824, n. 4, p. 598-607, 2012.

GEIB, E. et al. A Non-canonical Melanin Biosynthesis Pathway Protects *Aspergillus terreus* Conidia from Environmental Stress. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 5, p. 587-597, 2016.

GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 105-113, 2014.

GONÇALVES, R. C. R. **Estudo da estrutura e da atividade biológica do pigmento melanina produzido pelo fungo *Aspergillus nidulans***. 2008. 149 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

GONÇALVES, R. C. R.; LISBOA, H. C. F.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R.. Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p.1467-1474. 2012.

GONÇALVES, R. C. R.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Antioxidant Activity of the Melanin Pigment Extracted from *Aspergillus nidulans*. **Biol. Pharm. Bull**, v. 28, p.1129-1131, 2005.

GONÇALVES, R. C. R. et al. Effect of biotransformation by liver S9 enzymes on the mutagenicity and cytotoxicity of melanin extracted from *Aspergillus nidulans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p.1014-1021, 2015.

GONÇALVES, R. C. R. et al. Inhibition of nitric oxide and tumour necrosis factor- $\alpha$  production in peritoneal macrophages by *Aspergillus nidulans*. **The Pharmaceutical Society of Japan**, p.1-18, 2013.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons 1993.

HERNÁNDEZ, C. A. et al. Ethanol induction of laccase depends on nitrogen conditions of *Pycnoporus sanguineus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p.327-332, 2015.

HENSON, J. M et al. The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 37, p. 447-471, 1999.

HOROWITZ, N. H., et al. Genetic determination and enzymatic induction of tyrosinase in *Neurospora*. **J. Mol. Biol**, v. 2, p. 96-104, 1960.

ICHISHIMA, E. et al. Multiple forms of protyrosinase from *Aspergillus oryzae* and their mode of activation at pH 3.0. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 786, p. 25-31, 1984.

LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics And Biology**, v. 38, n. 2, p.143-158, 2003.

LIN, S. Y., et al. LAC2 encoding a secreted laccase is involved in apresorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare*. **MPMI**, v. 25, n. 12, p. 1552-1561, 2012.

LV, J. et al. Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 4, p. 452-458, 2017.

KUNWAR, A. et al. Melanin, a promising radioprotector: Mechanisms of actions in a mice model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 264, n. 2, p. 202-211, 2012.

MAO, X. B.; et al., Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepn production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1667-1672, 2005.

MARTINELLI, S.D; BAINBRIDGE, B.W. Phenoloxidases of *Aspergillus nidulans*. **Transactions British Mycological Society**, v. 2, p. 361-370, 1974.

MARZLUF., G. A. Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 47, p. 31-55, 1993.

MAUCH, R. M., et al. The copper interference with the melanogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Inst. Med. Trop**, v. 55, n. 2, p. 117-120, 2013.

NERI-NUMA, I. A. et al. Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 271-279, 2017.

OBATA, H. et al. Cloning of a novel Tyrosinase-encoding gene (melB) from *Aspergillus oryzae* and its overexpression in solid-state culture (rice Koji). **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 97, n. 6, p. 400-405, 2004.

- PAL, A. K. et al. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, 2014.
- PAGANO, M. Fungal pigments: an overview. In: SONS, J. W.; MACH, R. L.; SREENIVASARRASAD, S. (ed.). **Fungal bio-molecules: sources, applications and recent developments**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2015, p. 173-179.
- PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 70-76, 2015.
- PASSARINI, M. R. Z. et al. Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 and *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330. **AMB Express** p. 5:19, 2015.
- 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. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1991.
- POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. et al. Production of melanin pigment by fungi and Its Biotechnological Applications. **Melanin**, p.1-31, 2017.
- POSCH, A. E.; SPADIUT, O.; HERWIG, C. A novel method for fast and statistically verified morphological characterization of filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 7, p. 499-510, 2012.
- PRALEA, I. E. et al. From extraction to advanced analytical methods: The challenges of melanin analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 2019.
- PRETTI, T. S. **Otimização das condições de cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* para produção de melanina usando resíduos agroindustriais**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

RAMSDEN, C.; RILEY, P. A. Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 22, p. 2388-2395, 2014.

RAO, M. P. N.; XIAO, M.; LI, W. J. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with wide Applications. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.11-24, 22 jun. 2017.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. (ed.). **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

SAID, F. M. et al. Optimal C:N ratio for the production of red pigments by *Monascus ruber*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 2471-2479, 2014.

SAINI, A. S.; MELO, J. S. Biosorption of uranium by melanin: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 155-162, 2013.

SAPMAK, A., et al. The pbrB gene encodes a laccase required for DHN-melanin Synthesis in conidia of *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.

SAVA, V. M. et al. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immune-stimulating activity. **Food Research International**, v. 34, p. 337-343, 2001.

SCHERER, M.; FISCHER, R. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, p. 307-213, 2001.

SHAKYA, M. et al. Heavy metal removal from industrial wastewater using fungi: uptake mechanism and biochemical aspects. **J. Environ Eng.** 2015.

SILVEIRA, S. T. et al. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. **LWT**, v. 41, p. 170-174, 2008.

SOLANO, F. Melanins: Skin pigments and much more – types, structural models, biological functions, and formation routes. **New J. Sci**, p. 1-28, 2014.

SOUSA, G. S. **Otimização da produção de melanina pelo mutante MEL1 do fungo *Aspergillus nidulans* usando planejamento fatorial**. Dissertação (mestrado

em biotecnologia). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2017.

SUN, S. et al. Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure. **Food Chemistry**, p.801-807, 2016.

SZKLARZ, G.; et al. Production of phenoloxidases and peroxidases by woot-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, p. 234-240, 1989.

SZILÁGYI, Melinda et al. Autolytic enzymes are responsible for increased melanization of carbon stressed *Aspergillus nidulans* cultures. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 440-447, 2017.

TOLEDO, A. V. et al. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 99, p. 2-6, 2017.

UPADHYAY, S. et al. Lacases involved in 1,8-dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* are regulated by developmental factors and copper homeostasis. **Eukaryotic Cell** p. 1641-1652, 2013.

VENKATACHALAM, M. et al. Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, p. 38-47, 2018.

ZHANG, R. et al. Engineering melanin nanoparticles as an efficient drug-delivery system for imaging-guided chemotherapy. **Adv Mater**, v. 27, n. 34, p. 5063-5063, 2015.

ZOU, Y. et al. Fermentative production of melanina by the fungus *Auricularia auricular* using wheat bran extract as major nutrient source. **Food Science and Technology Research**, v. 23, n. 1, p. 23-29, 2016.

WHITE, L. P. Melanin: a naturally occurring cation exchange material. **Nature**, v. 182, p. 1427-1428, 1958.

YOUNGCHIM, S. et al. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 3, p.175-181, 2004.