



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS

CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE
SANTILLO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS APLICADAS
A PRODUTOS PARA SAÚDE

STEFANY ANASTÁCIO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE PIGMENTOS ESCUROS TIPO MELANINA PRODUZIDOS
POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE MILHO**

ANÁPOLIS – GO

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E
TECNOLÓGICAS HENRIQUE SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE

CARACTERIZAÇÃO DE PIGMENTOS
ESCUROS TIPO MELANINA PRODUZIDOS
POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE MILHO

STEFANY ANASTÁCIO DA SILVA

ANÁPOLIS – GO
2018

STEFANY ANASTÁCIO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE PIGMENTOS ESCUROS TIPO
MELANINA PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS
DE MILHO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde

Área de concentração: Farmácia

Orientadora: Dra. Claudia Cristina Garcia
Martin Didonet

ANÁPOLIS – GO

2018

RESUMO

A melanina possui uma variada aplicação industrial sendo de grande utilização na área de cosméticos, devido à sua excelente capacidade de absorver luz ultravioleta (UV). A síntese bacteriana de pigmentos de melanina é uma alternativa para produção em escala. Nesta pesquisa, foram utilizadas 17 bactérias isoladas de plantas de milho e foram avaliadas quanto à capacidade de produção de pigmentos escuros. Estas foram testadas por inoculação em meio batata suplementado com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) ou com L-tirosina (5 mmol L^{-1}). As bactérias foram então cultivadas e avaliadas quanto à produção de pigmentos escuros sendo selecionados quatro isolados (MT29, MT34, MT41 e MT70) com maior produção. Os pigmentos foram extraídos e analisados por espectrofotometria de absorção na região do UV-visível, espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O isolado MT70 foi considerado o mais promissor por sua produção quantitativa. Pelos dados obtidos foi possível detectar diferenças nos perfis IV entre a bactéria de referência HM053 e os isolados testados. De acordo com a análise no MEV os pigmentos são amorfos e com diferentes dimensões e espessuras. Apenas MT29 apresentou cristais em formato de agulhas. Os pigmentos apresentaram atividade de proteção celular frente aos raios UV e baixa atividade antioxidante contra o radical DPPH em 30 minutos. Assim, os pigmentos escuros estudados das quatro bactérias associadas a plantas de milho cultivadas no Cerrado goiano, podem ser considerados relacionados a melanina por suas propriedades e características.

Palavras-chave: bactérias endofíticas, triptofano, pigmento bacteriano

ABSTRACT

The melanin has a varied industrial application being of great use in the area of cosmetics, due to its excellent ability to absorb ultraviolet light (UV). Bacterial synthesis of melanin pigments is an alternative for scale production. In this research, 17 bacteria isolated from maize plants were used and evaluated for the production capacity of dark pigments. These were tested by inoculation in potato medium supplemented with L-tryptophan (5 mmol L⁻¹) or with L-tyrosine (5 mmol L⁻¹). Bacteria were then cultured and evaluated for the production of dark pigments. Four isolates (MT29, MT34, MT41 and MT70) were selected with higher production. The pigments were extracted and analyzed by UV-visible absorption spectrophotometry, infrared (IR) absorption spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). The MT70 isolate was considered the most promising because of its quantitative production. From the obtained data it was possible to detect differences in the IV profiles between the reference bacterium HM053 and the tested isolates. According to the SEM analysis the pigments are amorphous and with different dimensions and thicknesses. Only MT29 showed crystals in the shape of needles. The pigments showed cellular protection activity against UV rays and low antioxidant activity against the DPPH radical in 30 minutes. Thus, the dark pigments studied from the four bacteria associated with corn plants grown in the Cerrado of Goiás can be considered related to melanin because of its properties and characteristics.

Keywords: endophytic bacteria, tryptophan, bacterial pigment

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Via de eumelanogênese adaptada de PLONKA e GRABACKA (2006). Produção de eumelanina a partir da oxidação da tirosina (e/ou hidroxifenilalanina) à 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e DOPAquinona pela ação da tirosinase (Tyr). Posteriormente sofre ciclização à 5,6-dihidroxiindol (DHI) ou 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA) através da tirosinase relacionada à proteína 2 ou DOPAcromo tautomerase (TRP-2). A enzima DHICA oxidase (TRP-1) catalisa a oxidação de DHICA a indol-5,6-quinona ácido carboxílico que se polimeriza em uma reação espontânea à eumelanina.7
- Figura 2 – Via de feomelanogênese adaptada de PLONKA e GRABACKA (2006). A etapa de cisteinização da DOPAquinona em presença de L-cisteína ou glutatona e a etapa de polimerização são espontâneas, levando a formação de feomelanina.9
- Figura 3 – Via biossintética de alomelanogênese – melanina-DHN a partir de malonil Co-A adaptada de PLONKA e GRABACKA (2006) e YURLOVA et al. (2008). O primeiro produto desta via é 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8-THN) pela ação da enzima policetídeo sintase (PCS). Este metabólito é reduzido a scitalona, o qual é desidratado a 1,3,6-trihidroxinaftaleno (1,3,6-THN). Este metabólito é reduzido a vermelona, o qual é desidratado à 1,8-dihidroxinaftaleno (1,8-DHN). A(s) enzima(s) que catalisam a reação de polimerização final, oxidando o DHN à melanina, não foram adequadamente estudadas mas parecem ser lacase.10
- Figura 4 – Via de alomelanogênese (piomelanina) adaptada de PLONKA e GRABACKA (2006). A tirosina através da tirosil aminotransferase (Tyr AT) se converte em p-hidrofetilpiruvato. Pela ação da hidroxifenilpiruvato desidrogenase (HPPD), o p-hidrofetilpiruvato se converte em homogentisato. O homogentisato acumulado do catabolismo da tirosina oxida ao benzoquinoacetato e então, se polimeriza levando a formação de piomelanina.11
- Figura 5 – Meio batata suplementado com A- L-tirosina (5mmol L⁻¹) e B- L-triptofano (5 mmol L⁻¹) na placa DeepWell® após crescimento bacteriano e de melanina no

escuro em agitador orbital, a 28 °C e 140 rpm após 168 horas de incubação. A-1, B-1, C-1: MT8; D-1, E-1, F-1: MT10; G-1, H-1, A-2: MT22; B-2, C-2, D-2: MT23; E-2, F-2, G-2: MT26; H-2, A-3, B-3: MT29; C-3, D-3, E-3: MT30; F-3, G-3, H-3: MT31; A-4, B-4, C-4: MT34; D-4, E-4, F-4: MT39, G-4, H-4, A-5: MT40; B-5, C-5, D-5: MT41; E-5, F-5, G-5: MT43; H-5, A-6, B-6: MT 45; C-6, D-6, E-6: MT51; F-6, G-6, H-6: MT70; A-7, B-7, C-7: MT75; D-7, E-7, F-7: BR322; G-7, H-7, A-8, B-8, C-8, D-8: Controle negativo.....28

Figura 6 – Bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e crescimento celular (DO_{600}) do isolado MT29 ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 140 rpm no escuro32

Figura 7 – Bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e crescimento celular (DO_{600}) do isolado MT34 ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 140 rpm no escuro34

Figura 8 – Bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e crescimento celular (DO_{600}) do isolado MT41 ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 140 rpm no escuro35

Figura 9 – Bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e crescimento celular (DO_{600}) do isolado MT70 ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 140 rpm no escuro36

Figura 10 – Bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e crescimento celular (DO_{600}) da estirpe HM053 ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 140 rpm no escuro37

Figura 11 – Média de bioprodução de melanina-like ao final de 168 horas de incubação dos isolados MT29, MT34, MT41, MT70 e HM053 em meio batata suplementado com L-triptofano (5 mmol L^{-1}), cultivadas em agitador orbital à 140 rpm no escuro.....38

Figura 12 – Média de bioprodução de proteínas totais de bactérias isoladas de milho e *A. brasilense* em 168 horas de incubação em meio batata suplementado com L-triptofano39

Figura 13 – Biomassa bacteriana (mg mL^{-1}) e bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 28°C e agitação de 140 rpm no escuro dos isolados MT29, MT34, MT41 e MT70.....	41
Figura 14 – A) Espectro de absorção da região do UV-vis para a melanina extraída da estirpe HM053 nas concentrações (- - -) $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$ e (---) $0,008 \text{ mg mL}^{-1}$ em água. B) Inset mostrando a região de 215 a 350 nm	46
Figura 15 – Espectro de absorção da região do UV-vis para a melanina Sigma-Aldrich®.....	46
Figura 16 – Caracterização morfológica da superfície dos pigmentos marrons produzidos pelas bactérias MT29, MT34, MT41 e MT70 obtidas pela técnica de MEV	47
Figura 17 – Avaliação da atividade de proteção celular com a presença do pigmento marrom em meio batata (MB) e a proteção contra os raios UV a partir do sobrenadante do cultivo dos isolados bacterianos MT29, MT34, MT41, MT70, HM053 (<i>A. brasilense</i>) e HB101 (<i>E. coli</i>) em meios com e sem triptofano (Try). UFC – Unidades Formadoras de Colônia.....	49
Figura 18 – Atividade antioxidante para o radical DPPH das melaninas produzidas pelas estirpes MT29, MT34, MT41 e MT70 comparadas ao BHT em concentrações de 50 a $600 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 30 minutos em repouso no escuro.....	51
Figura 19 – Espectrograma da região do infravermelho da melanina extraída de MT29 após 168 horas de incubação em agitador orbital a 140 rpm e 28°C no escuro	64
Figura 20 – Espectrograma da região do infravermelho da melanina extraída de MT34 após 168 horas de incubação em agitador orbital a 140 rpm e 28°C no escuro	65
Figura 21 – Espectrograma da região do infravermelho da melanina extraída de MT41 após 168 horas de incubação em agitador orbital a 140 rpm e 28°C no escuro	66

Figura 22 – Espectrograma da região do infravermelho da melanina extraída de MT70 após 168 horas de incubação em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro	67
Figura 23 – Espectrograma da região do infravermelho da melanina comercial Sigma-Aldrich®	68
Figura 24 – Sobreposição dos espectrogramas da região do infravermelho das melaninas extraídas das estirpes MT29, MT34, MT41, MT70 e HM053 após 168 horas de incubação em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação estimada da produção de melanina em meio batata suplementado com L-triptofano (5 mmol L ⁻¹) e meio batata suplementado com L-tirosina (5 mmol L ⁻¹) no escuro em agitador orbital, a 28 °C e 140 rpm por 168 horas utilizando espectrofotometria em 400 nm. DP – desvio padrão de triplicata	30
Tabela 2 – Análise dos picos de absorção na região do infravermelho da melanina com determinação dos grupos funcionais das bactérias isoladas de milho e da bactéria controle <i>A. brasilense</i> HM053.....	43
Tabela 3 – Quantidade de melanina produzida por cada isolado durante o período de incubação em meio batata + L-triptofano (5 mmol L ⁻¹) em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro.....	62
Tabela 4 – Quantidade de proteína produzida por cada isolado durante o período de incubação em meio batata + L-triptofano (5 mmol L ⁻¹) em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro.....	62
Tabela 5 – DO ₆₀₀ de cada isolado durante o período de incubação em meio batata + L-triptofano (5 mmol L ⁻¹) em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro	63
Tabela 6 – Valor do pH de cada meio de cultura durante o período de incubação em meio batata + L-triptofano (5 mmol L ⁻¹) em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHT – hidroxitolueno butilado (*butylated hydroxytoluene*)

BSA – soro albumina bovina (*bovine serum albumin*)

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

COX – cicloxigenase

DCT – dopacromo tautomerase

DHI – dihidroxi-indol

DHICA – ácido dihidroxi-indol carboxílico

DO₄₀₀ – densidade ótica em 400 nanômetros

DO₆₀₀ – densidade ótica em 600 nanômetros

1,8-DHN – 1,8-dihidroxi-naftaleno

1,3,6-THN – 1,3,6-trihidroxi-naftaleno

1,3,6,8-THN – 1,3,6,8-tetrahidroxi-naftaleno

DOPA – 3,4-dihidroxi-fenilalanina

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

HPPD – hidroxifenilpiruvato desidrogenase

IV – infravermelho

LA – Luria-Bertani Ágar

LB – Luria-Bertani

LOX – lipoxigenase

MEV – microscopia eletrônica de varredura

NB – *nutrient broth*

NO – óxido nítrico

PCS – policetídeo sintase

UFC – unidades formadoras de colônia

TRP-1 – tirosinase relacionada à proteína 1

TRP-2 – tirosinase relacionada à proteína 2

Try – triptofano

TY – *tryptone yeast*

Tyr – tirosina (*tyrosine*)

Tyr AT – tirosil aminotransferase

UV – ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MELANINAS.....	3
2.1 EUMELANINAS.....	5
2.2 FEOMELANINAS	7
2.3 ALOMELANINAS.....	9
2.4 MELANINAS BACTERIANAS	11
3. PRODUÇÃO DE MELANINA	15
3.1 ROTA DE SÍNTESE A PARTIR DA TIROSINA.....	15
3.2 ROTA DE SÍNTESE A PARTIR DO TRIPTOFANO	16
4. ATIVIDADE BIOLÓGICA DA MELANINA.....	18
5. OBJETIVOS	20
5.1 OBJETIVO GERAL.....	20
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
6. METODOLOGIA.....	21
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO	21
6.2 ARMAZENAMENTO E MANUTENÇÃO DAS BACTÉRIAS	21
6.3 TRIAGEM DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE MELANINA	22
6.4 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE MELANINA	23

6.4.1 Análise de proteínas.....	23
6.4.2 Contagem de células e biomassa.....	24
6.5 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PIGMENTOS MELANINA-LIKE.....	24
6.5.1 Análise de espectroscopia no infravermelho (IV)	25
6.5.2 Análise de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis)	25
6.5.3 Análise de atividade de proteção celular	26
6.5.4 Análise de atividade antioxidante para radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	26
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
8. CONCLUSÃO.....	53
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO I.....	59
ANEXO II.....	62
ANEXO III.....	64

1. INTRODUÇÃO

Melaninas são pigmentos naturais complexos de coloração variando de marrom à preta que são amplamente distribuídos nos organismos (KURIAN; BHAT, 2013), incluindo várias espécies de bactérias, fungos e helmintos patogênicos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003).

As melaninas são compostas por substâncias fenólicas e/ou indólicas polimerizadas (HENSON; BUTLER; DAY, 1999) e possuem diversas funções biológicas que incluem fotoproteção, termorregulação, captação de radicais livres, quelação de cátions e antibióticos (KURIAN; BHAT, 2013).

Acredita-se que a pigmentação da pele é o fator de fotoproteção mais importante, uma vez que a melanina, além de ser capaz de absorver luz em um amplo espectro UV, tem propriedades antioxidantes e de eliminação de radicais livres (BRENNER; HEARING, 2008).

A pele humana é constantemente exposta à radiação ultravioleta (UV) e essa exposição influencia a função e sobrevivência de muitos tipos de células e é considerada como o principal fator na indução do câncer de pele (BRENNER; HEARING, 2008). Câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento e espalhamento incontrolável de células anormais. Se o espalhamento não for controlado, pode levar à morte. A maioria dos mais de 5 milhões de casos de câncer de pele diagnosticados anualmente podem ser prevenidos protegendo-se a pele da exposição excessiva ao sol e não utilizando-se equipamentos fechados de bronzeamento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

A melanina possui uma variada aplicação industrial. É utilizada em indústrias de cosméticos, devido à sua excelente capacidade de absorver luz UV. Pode também ser utilizada para substituir o ácido para-aminobenzoico (PABA), que também absorve luz UV. Também pode ser utilizada em tintas, vernizes e outras formulações protetoras de superfícies para fornecer uma maior proteção UV (KOKJOHN; SCHRADER, 2000).

A radiação UV é responsável por uma ampla variedade de diversos efeitos agudos e crônicos na pele. Respostas agudas da pele humana à radiação UV incluem fotodanos como eritemas, mutação, imunossupressão, síntese de vitamina D e bronzeamento. Efeitos crônicos incluem fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese, que se consideram ser induzidos pela mutação ou imunossupressão (BRENNER; HEARING, 2008).

Tendo em vista a importância da fotoproteção da pele para a saúde humana na prevenção de doenças e o papel que a melanina natural da pele desempenha na fotoproteção, é de grande importância se obter uma fonte natural alternativa, segura e eficaz na produção de melanina, que possa ser utilizada na fabricação de cosméticos fotoprotetores e outras substâncias capazes de proteger a superfície de objetos expostos à radiação.

Muitas bactérias, incluindo algumas espécies de *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, etc, naturalmente expressam a enzima tirosinase, a principal enzima que participa da via metabólica para a produção da melanina para proteção contra danos UV e para aumentar a virulência e patogênese (SADASIVAN; NEYRA, 1987; SANTOS; STEPHANOPOULOS, 2008).

Neste estudo serão utilizadas bactérias isoladas de plantas de milho que produzam melaninas para realização de análises para caracterizações físico-químicas, bioquímicas e de atividade biológica. Espera-se que novos pigmentos tipo melanina sejam produzidos por bactérias isoladas do Cerrado e que possam ser utilizadas em estudos futuros para formulação de bioprodutos a partir do conhecimento da sua estrutura e características químicas e biológicas.

2. MELANINAS

As melaninas são pigmentos que estão presentes em uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e helmintos patogênicos, constituídos por polímeros polifenólicos complexos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003).

Elas são uma importante classe de pigmentos naturais que têm atraído grande atenção devido ao seu papel biológico em fotoproteção e aplicações tecnológicas (GÓMEZ-MARÍN; SÁNCHEZ, 2010). Além disso, melaninas desempenham importantes funções em organismos vivos, tais como diferenciação fenotípica, camuflagem, fortalecedores de parede celular em plantas, cor da pele e proteção contra raios UV em humanos, agente protetor contra estresse ambiental em microrganismos, etc (KURIAN; BHAT, 2013). Sua biossíntese é controlada por fatores genéticos, ambientais e hormonais (MAGARELLI; PASSAMONTI; RENIERI, 2010).

As melaninas constituem um grupo diverso de polímeros aromáticos com diferentes potenciais de aplicação em indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Síntese bacteriana de melanina é uma alternativa para produção em escala comercial por ser uma fonte natural deste pigmento (PITHAWALA; JAIN, 2013).

Estes pigmentos são muito estáveis fotoquimicamente e algumas melaninas são praticamente insolúveis na maioria dos solventes orgânicos, ácidos e água (GÓMEZ-MARÍN; SÁNCHEZ, 2010). As melaninas provenientes de microrganismos são moléculas de alto peso molecular que são descoloridas por agentes oxidantes (SAJJAN et al., 2013).

Os pigmentos de melaninas são metabólitos heterogêneos compostos de diferentes unidades conectadas por fortes ligações carbono-carbono, que fazem a caracterização sistemática das melaninas muito difícil (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014).

Em animais, fenilalanina é hidroxilada à L-tirosina, a partir da qual é formada a DOPAquinona, o precursor de eumelanina e feomelanina. Em microrganismos, a melanina é geralmente sintetizada através de vários fenol-oxidases (tais como tirosinases, lacases, ou catacolases) e/ou as vias de poliketido-sintase. A capacidade de bactérias patogênicas produzirem melanina tem origem nas realizações evolutivas de bactérias de vida livre. Em alguns gêneros contendo cepas de vida livre e parasitárias (exemplo: *Vibrio sp.*), há vias piomelanogênicas (formadas da tirosina ou fenilalanina através de acumulação de ácido homogentísico) e eu/feomelanogênicas, algumas vezes simultaneamente no mesmo organismo (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014)

Bactérias conhecidas se mostraram produtoras de pigmentos melanina-like como estirpes de *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 (SADASIVAN; NEYRA, 1987), *Bacillus subtilis* (GÓMEZ-MARÍN; SÁNCHEZ, 2010), *Bacillus spp.* estirpe BTCZ31 (KURIAN; NAIR; BHAT, 2015), *Bacillus thuringiensis* subesp. *Dendrolimus Bt L-7601* (CHEN et al., 2004), isolado AT18 de *Stenotrophomonas maltophilia* (GENG et al., 2008a), isolados BrY de *Shewanella algae* (TURICK et al., 2010), estirpe GSK de *Klebsiella sp.* (SAJJAN et al., 2013), estirpe C5424 de *Burkholderia cenocepacia* (KEITH et al., 2007), estirpe de *Actinomyces sp.* (VASANTHABHARATHI; LAKSHMINARAYANAN; JAYALAKSHMI, 2011), etc.

Pigmentos de melanina extraídos de bactérias de *Azotobacter chroococcum* estirpe 184 se mostraram amorfos, heterogêneos, insolúveis e resistentes à cristalização (BANERJEE; SUPAKAR; BANERJEE, 2014). As estruturas químicas exatas das melaninas ainda são desconhecidas devido à copolimerização complexa e às modificações pós polimerização (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014).

As melaninas são formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos tais como catecóis e 1,8-dihidroxi-naftaleno (alomelaninas), DOPA (eumelaninas) e cisteinil-DOPA (feomelaninas) (SHIVPRASAD; PAGE, 1989).

As melaninas são os pigmentos mais comuns produzidos na natureza e esses complexos biopolímeros são divididos em categorias de melaninas: eumelaninas, feomelaninas e alomelaninas (TURICK et al., 2010). Também foram identificadas

melaninas mistas (uma combinação de duas melaninas) e neuromelaninas (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014)

Em geral, feomelaninas contêm enxofre, enquanto que alomelaninas não contêm nitrogênio. Outra diferença importante diz respeito a configuração dos resíduos de quinona ou quinonimina em melaninas: configuração orto- está presente em eumelaninas e feomelaninas, e configuração para- (polímeros γ -glutaminil-4-hidroxibenzeno) ou meta- (polímeros de dihidroxinaftaleno) em alomelaninas (PLONKA; GRABACKA, 2006).

As eumelaninas e as feomelaninas são encontradas principalmente em espécies animais, enquanto que alomelaninas são encontradas em plantas e microrganismos (SHIVPRASAD; PAGE, 1989).

A enzima tirosinase é considerada a principal enzima da via de síntese da melanina em animais (MIOT et al., 2009). Os três membros da família relacionada a tirosinase são a tirosinase, tirosinase relacionada à proteína 1 (TRP-1) e tirosinase relacionada à proteína 2 (TRP-2) também conhecida como DCT – dopacromo tautomerase. Estes estão envolvidos no processo de melanogênese, levando a produção de eumelanina ou feomelanina (MIOT et al., 2009).

2.1 EUMELANINAS

Eumelaninas são pigmentos de coloração marrom à preta que são principalmente sintetizadas a partir da tirosina e/ou fenilalanina com a participação da enzima tirosinase (PLONKA; GRABACKA, 2006).

A via de biossíntese da eumelanina envolve três enzimas: tirosinase, tirosinase relacionada à proteína 1 (TRP-1) e tirosinase relacionada à proteína 2 (TRP-2), também conhecida como dopacromo tautomerase (DCT) (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014).

A reação para a formação de melanina (Figura 1) acontece em presença de oxigênio molecular e envolve a hidroxilação do substrato tirosina em 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), com a liberação de uma molécula de água, catalisada

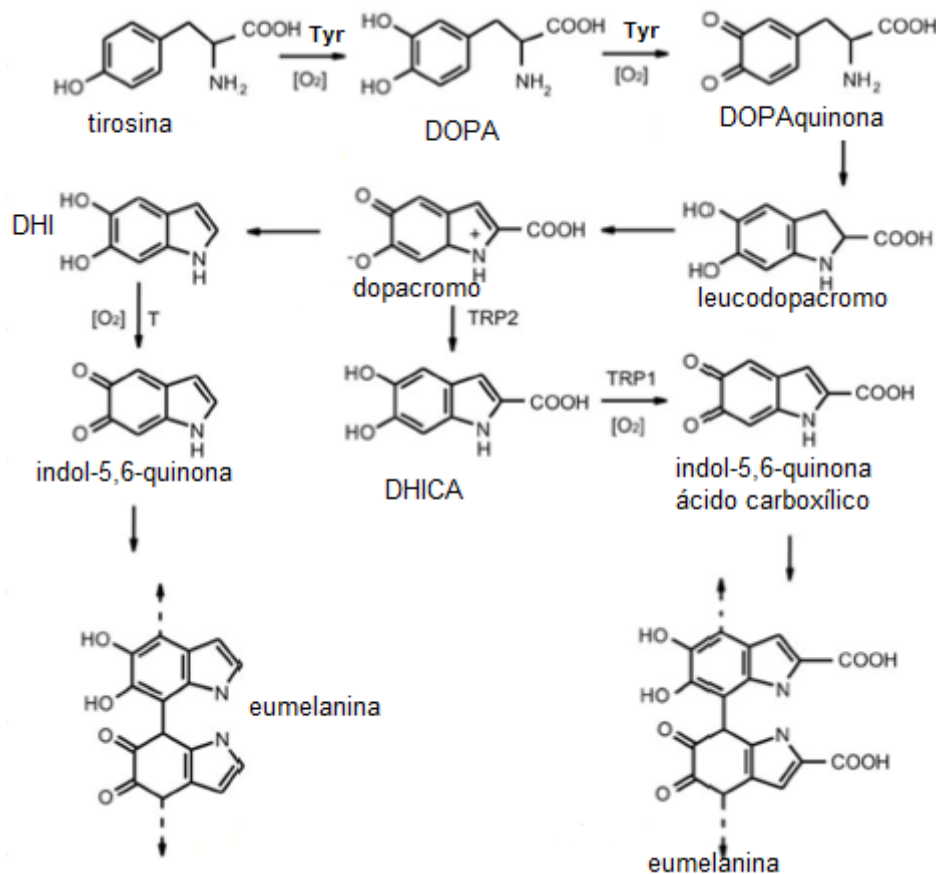
por tirosinase. A tirosinase também está envolvida na oxidação de DOPA em DOPAquinona e na oxidação de 5,6-dihidroxi-indol (DHI) a indol-5,6-quinona (OLIVEIRA; ROCHA; GUILLO, 2004).

A partir da formação da DOPAquinona, a presença ou ausência de cisteína determina o rumo da reação para a síntese de eumelanina ou feomelanina. Na ausência de cisteína (glutathione), a DOPAquinona é convertida em ciclodopa (leucodopacromo) e esta em DOPAcromo. Há duas vias de degradação de DOPAcromo: uma que forma DHI (5,6-dihidroxi-indol) em maior proporção; e outra que forma DHICA (5,6-dihidroxi-indol-2-ácido carboxílico) em menor quantidade. (MIOT, SILVA, 2009).

A enzima DOPAcromo tautomerase (TRP-2) converte o componente DOPAcromo para 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA). A enzima DHICA oxidase (TRP-1) catalisa a oxidação de DHICA a indol-5,6-quinona ácido carboxílico. Como produto final da reação há formação da eumelanina (OLIVEIRA; ROCHA; GUILLO, 2004).

Embora muitos estudos apontem que a fração dihidroxi-indol (5,6-dihidroxi-indol (DHI) e ácido dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA) atue como constituinte básico da eumelanina e se polimerize em uma distribuição heteromérica (o número de unidades fundamentais variam de três a cinco), mesmo assim ainda hoje, nenhuma estrutura molecular completa foi reportada na literatura (BANERJEE; SUPAKAR; BANERJEE, 2014).

Figura 1 – Via de eumelanogênese adaptada de PLONKA e GRABACKA (2006). Produção de eumelanina a partir da oxidação da tirosina (e/ou hidroxifenilalanina) à 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e DOPAquinona pela ação da tirosinase (Tyr). Posteriormente sofre ciclização à 5,6-dihidroxiindol (DHI) ou 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA) através da tirosinase relacionada à proteína 2 ou DOPAcromo tautomerase (TRP-2). A enzima DHICA oxidase (TRP-1) catalisa a oxidação de DHICA a indol-5,6-quinona ácido carboxílico que se polimeriza em uma reação espontânea à eumelanina.



A eumelanina absorve e dispersa a luz ultravioleta, atenuando sua penetração na pele e reduzindo os efeitos nocivos do sol (MIOT et al., 2009).

2.2 FEOMELANINAS

As feomelaninas são pigmentos de coloração vermelha ou amarela que também são sintetizadas a partir da tirosina, assim como as eumelaninas até a

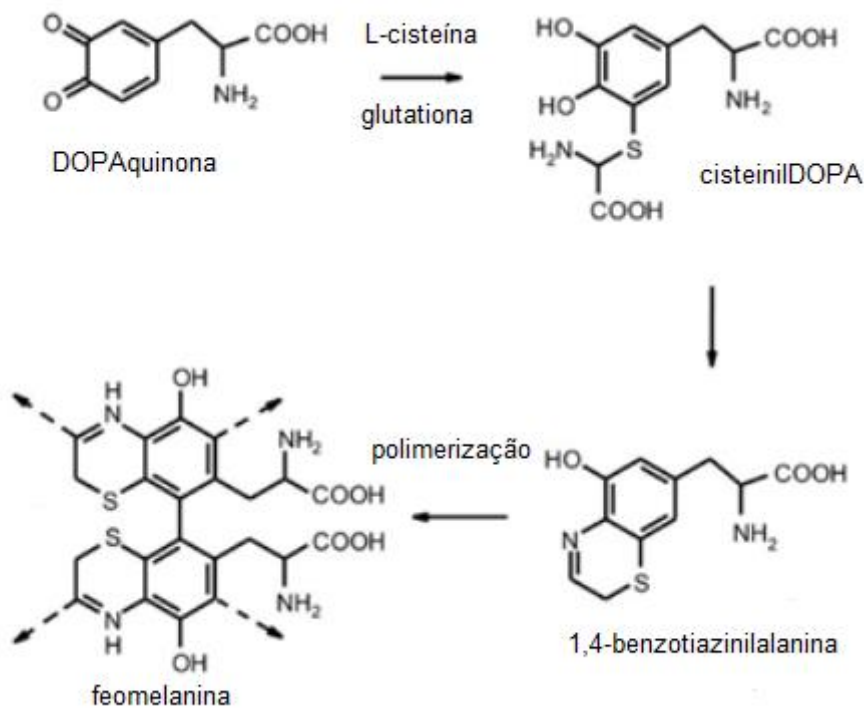
DOPAquinona (KURIAN; BHAT, 2013), então, a DOPAquinona sofre cisteinização direta ou mediada pela glutathione. O produto final desta reação, cisteinilDOPA, se polimeriza ainda mais em derivados de benzotiazinas até formar a feomelanina (PLONKA; GRABACKA, 2006).

Na presença de cisteína, DOPAquinona rapidamente reage com tal substância para gerar 5-S-cisteinilDOPA, e, em menor proporção, a 2-S-cisteinilDOPA. Logo, as cisteinilDOPAs são oxidadas em intermediários benzotiazínicos e, finalmente, produzem feomelaninas (MIOT et al., 2009). As feomelaninas consistem na maioria das vezes de unidades de benzotiazinas degradadas, até certo ponto, ao benzotiazol (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014).

As feomelaninas são derivadas de monômeros contendo enxofre como glutathione ou cisteinilDOPA (GÓMEZ-MARÍN; SÁNCHEZ, 2010). A biossíntese da feomelanina acontece através de reações espontâneas (ciclização e polimerização), como pode ser visualizado na Figura 2 (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014).

Em contraste às eumelaninas, as feomelaninas são inclinadas à fotodegradação e podem contribuir para os efeitos nocivos da radiação UV, pois podem gerar peróxido de hidrogênio e ânions superóxidos que podem causar mutações nos melanócitos ou outras células (BRENNER; HEARING, 2008).

Figura 2 – Via de feomelanogênese adaptada de PLONKA e GRABACKA (2006). A etapa de cisteinização da DOPAquinona em presença de L-cisteína ou glutatona e a etapa de polimerização são espontâneas, levando a formação de feomelanina.



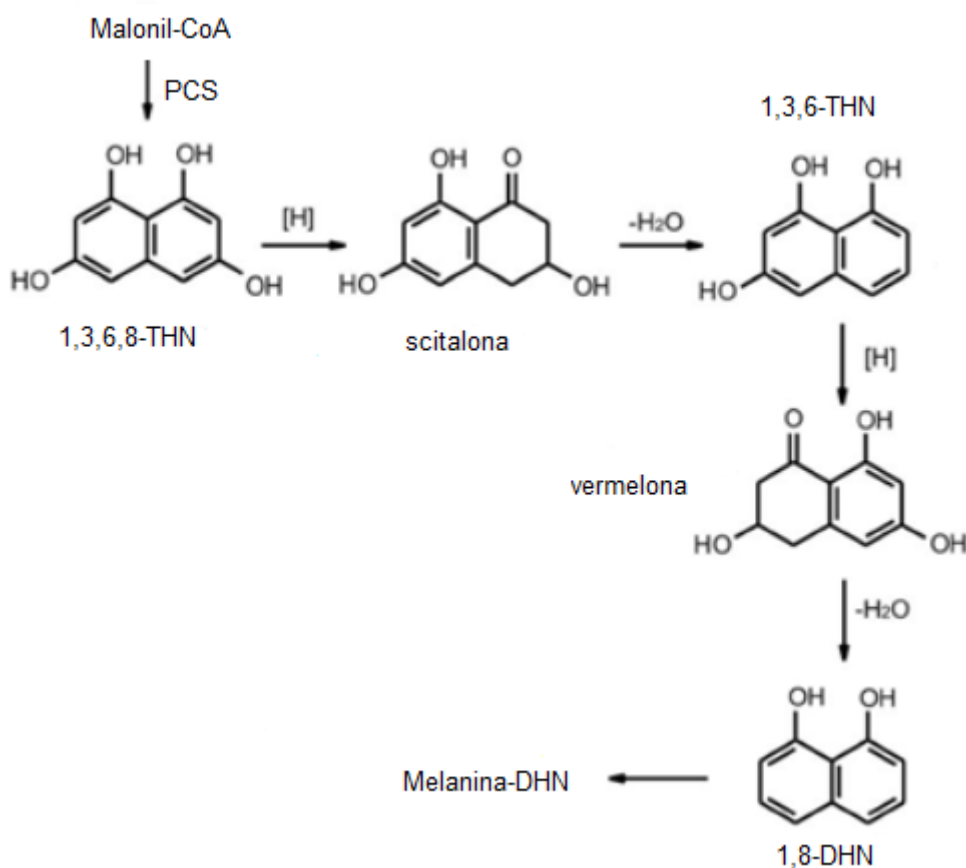
A feomelanina tem um grande potencial em gerar radicais livres, em resposta à radiação ultravioleta, já que são capazes de gerar danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA). Dessa forma, podem contribuir para os efeitos fototóxicos da radiação UV (MIOT et al., 2009).

2.3 ALOMELANINAS

A classe das alomelaninas é a que possui mais grupos heterogêneos de polímeros e a menos estudada. Surgiu através da oxidação/polimerização do dihidroxi-naftaleno (DHN) ou tetrahidroxi-naftaleno (THN), via pentacetídeo, levando através da flaviolina a formação de vários polímeros coloridos de melaninas-DHN (Figura 3) (YURLOVA; HOOG; FEDOROVA, 2008), piomelanina (Figura 4), γ -

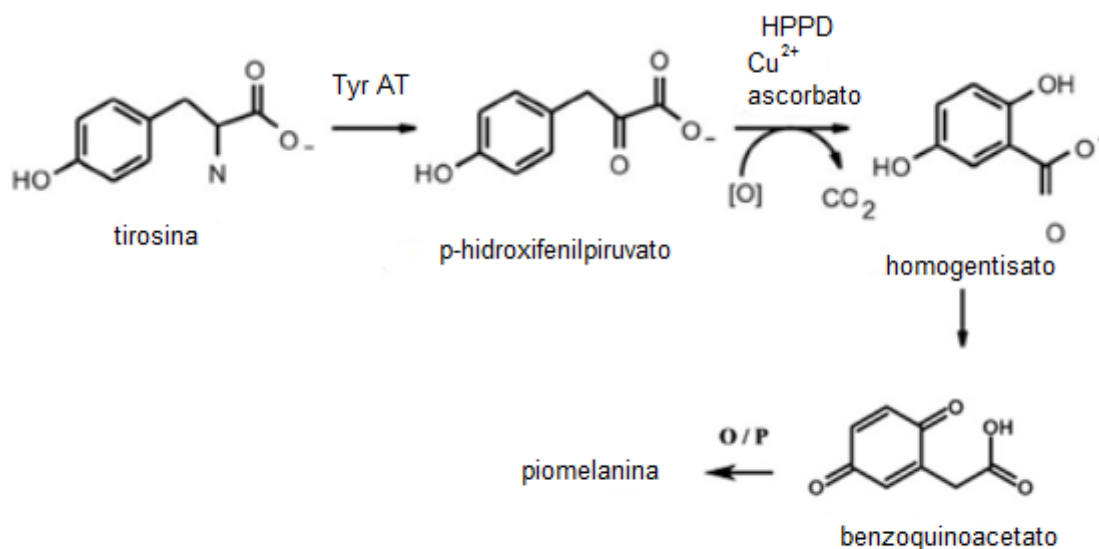
glutaminil-4-hidroxibenzeno, catecóis, assim como ácido 4-hidroxifenilacético (PLONKA; GRABACKA, 2006).

Figura 3 – Via biossintética de alomelanogênese – melanina-DHN a partir de malonil Co-A adaptada de PLONKA e GRABACKA (2006) e YURLOVA et al. (2008). O primeiro produto desta via é 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8-THN) pela ação da enzima poliketídeo sintase (PCS). Este metabólito é reduzido a scitalona, o qual é desidratado a 1,3,6-trihidroxinaftaleno (1,3,6-THN). Este metabólito é reduzido a vermelona, o qual é desidratado à 1,8-dihidroxinaftaleno (1,8-DHN). A(s) enzima(s) que catalisam a reação de polimerização final, oxidando o DHN à melanina, não foram adequadamente estudadas mas parecem ser lacase.



Em geral, o excesso de ácido homogentísico acumulado do catabolismo da tirosina oxidada ao benzoquinoacetano, e então se polimeriza, levando a produção de piomelanina.

Figura 4 – Via de alomelanogênese (piomelanina) adaptada de PLONKA e GRABACKA (2006). A tirosina através da tirosil aminotransferase (Tyr AT) se converte em p-hidroxifenilpiruvato. Pela ação da hidroxifenilpiruvato desidrogenase (HPPD), o p-hidroxifenilpiruvato se converte em homogentisato. O homogentisato acumulado do catabolismo da tirosina oxida ao benzoquinoacetato e então, se polimeriza levando a formação de piemelanina.



2.4 MELANINAS BACTERIANAS

A presença de melanina no reino das bactérias é uma questão de debate contínuo entre os pesquisadores dessa área. Do ponto de vista químico, a única característica comum entre as melaninas bacterianas é o fato de serem obtidas pela polimerização oxidativa de substâncias fenólicas. Deste modo, as melaninas formam um grupo bastante heterogêneo de biopolímeros (PLONKA; GRABACKA, 2006).

Muitas bactérias, incluindo algumas espécies de *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, etc, naturalmente expressam precursores que são capazes de produzir melanina para proteção contra danos UV e para aumentar a virulência e patogênese (SANTOS; STEPHANOPOULOS, 2008). Algumas espécies de bactérias foram reportadas como produtoras de melanina,

porém, poucas foram caracterizadas molecularmente (GÓMEZ-MARÍN; SÁNCHEZ, 2010).

CUBO et al. (1988) reportaram diferentes cepas de *Rhizobium* com capacidade de produzir melanina, tais como *R. leguminosarum* biovars *viceae*, *trifolii* e *phaseoli*, *R. meliloti*, *R. fredii*. As cepas foram cultivadas em meio TY suplementados com L-tirosina 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e sulfato de cobre 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e os pigmentos tipo melanina apareceram de 3 a 4 dias para produtores rápidos e de 7 a 10 dias para produtores lentos.

Células de *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 cultivadas em meio malato livre de nitrogênio produziram pigmentos escuros, que pela coloração marrom escuro ou preto, foram denominados como pigmentos tipo melanina. Estes pigmentos não se dissolveram em água ou solventes orgânicos, mas foram solúveis em meios alcalinos aquecidos ou resfriados (NaOH 1 N ou KOH 1 N). Os pigmentos mostraram propriedades de branqueamento similares as melaninas, absorção máxima em 280 nm e um pico no range entre 310 e 320 nm, que foi reportado para outros tipos de melaninas (SADASIVAN; NEYRA, 1987).

Gómez-Marín e Sánchez (2010) reportaram a produção de feomelanina por estirpes de *Bacillus subtilis*, que demonstrou características típicas das melaninas em geral, insolúveis em solventes orgânicos.

Kurian, Nair e Bhat (2015) demonstraram que melanina bacteriana produzida por *Bacillus spp.* BTCZ31 apresentou boa atividade anti-inflamatória *in vitro*. A atividade de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) da melanina pura foi comparável ao do padrão de ácido ascórbico. A melanina mesmo em concentrações de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mostrou 92,39% de atividade de captura de Fe^{2+} e a atividade aumentava conforme a concentração de melanina aumentava. A melanina purificada de *Bacillus spp.* BTCZ31 inibiu as enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) em altas concentrações. Ainda neste estudo os níveis de nitrito celular, um indicador de óxido nítrico (NO) produzido durante inflamação, foram reduzidos enquanto a concentração de melanina aumentava (KURIAN; NAIR; BHAT, 2015).

Outro estudo reportou que a estirpe isolada EP83 produziu uma grande quantidade de um pigmento de melanina muito similar à melanina comum (PITHAWALA; JAIN, 2013).

Isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* AT18 também mostraram potencial produtor de melanina. A eumelanina produzida foi solúvel em água e demonstrou fotoproteção contra a radiação UV-A (GENG et al., 2008a).

Piomelanina bacteriana produzida por isolados de *Shewanella algae* BrY demonstrou capacidade de transferência de elétrons na redução de metais, de sorção na superfície por vários microrganismos, sorção de minerais e capacidade de quelatão de metais (TURICK et al., 2010).

Estirpes de *Klebsiella sp.* GSK produziram eumelanina e a propriedade característica desta melanina foi sua estabilidade térmica. Síntese bacteriana deste tipo de pigmento tem potencial para ser utilizado efetivamente em isolamento térmico (SAJJAN et al., 2013).

As estirpes BC7, J2315, C3865 e C5424 de *Burkholderia cenocepacia* produziram pigmentos marrons escuros após 36 horas de incubação à 37° C em meio ágar Luria-Bertani (LB) (KEITH et al., 2007). As estirpes pigmentadas sobreviveram intracelularmente com células fagocitárias. O pigmento melanina-like marrom foi capaz de captar radicais livres, resultando na atenuação do ataque oxidativo à célula hospedeira. Foi sugerido que a melanina produzida pela *B. cenocepacia* C5424 foi sintetizada por um precursor de ácido homogentísico, sendo classificada como piomelanina (KEITH et al., 2007).

Azotobacter chroococcum 184 produziu pigmentos escuros quando cresceu em altas taxas de aeração em condições para fixação de nitrogênio através de fontes de acetato de amônio ou gás nitrogênio (SHIVPRASAD; PAGE, 1989). O catecol que foi produzido pelo microrganismo desapareceu na melanização, sugerindo que a melanina era derivada do catecol e que o catecol foi tanto um indutor quanto um substrato para a melanização. Neste estudo, os aminoácidos L-tirosina e L-cisteína não aumentaram a formação de melanina na estirpe 184, sugerindo que a estirpe de *A. chroococcum* dependente de sódio produziu uma alomelanina (SHIVPRASAD; PAGE, 1989). Esta melanina apresentou solubilidade

em NaOH 0,5 M aquecido e em Na₂CO₃ 1 M e insolubilidade em água gelada, água quente, etanol, clorofórmio, acetona e NaOH 0,5 M gelado. Foram utilizados padrão de referência de dopa-melanina (Sigma®), catecol auto-oxidado e melanina-indol auto-oxidada para as análises de espectrometria UV (SHIVPRASAD; PAGE, 1989).

Estirpes de *Actinomycetes* sp produziram melanina solúvel em água, que foi caracterizado através de espectroscopia IV (VASANTHABHARATHI; LAKSHMINARAYANAN; JAYALAKSHMI, 2011). A produção do pigmento foi observada utilizando L-tirosina como substrato. A melanina produzida mostrou atividade contra potenciais patógenos. A atividade antimicrobiana máxima foi observada com *Escherichia coli* (20 mm) e *Lactobacillus vulgaris* (20 mm) (VASANTHABHARATHI; LAKSHMINARAYANAN; JAYALAKSHMI, 2011)

Bactéria capazes de produzir melanina na presença de L-tirosina foram isoladas do solo e identificadas como *Klebsiella* sp. GSK a partir de sua morfologia, bioquímica e sequenciamento 16S do rDNA (SAJJAN et al., 2010). A caracterização química do pigmento produzido mostrou que a melanina era resistente ao meio ácido, solúvel em meio básico e insolúvel na grande maioria dos solventes orgânicos e água. O pigmento sofreu clareamento pela ação de oxidantes e redutores. Estudos de inibição com agentes inibidores específicos mostraram que a melanina produzida foi sintetizada a partir da DOPA (SAJJAN et al., 2010).

Células de *Bacillus thuringiensis* subesp. *dendrolimus* Bt L-7601 cresceram em meio líquido LB ou caldo nutritivo (NB – *nutrient broth*), que não tinham L-tirosina, em um agitador rotativo à 180 rpm e 30 ° C durante a noite por 13 horas e produziram um pigmento marrom (CHEN et al., 2004). O pigmento produzido não foi facilmente solúvel em água, e foi insolúvel em solventes orgânicos como etanol, éter e clorofórmio. Este pigmento foi facilmente solúvel em solventes alcalinos, especialmente quando aquecidos (CHEN et al., 2004). Quando comparado ao *Bacillus thuringiensis* subesp. *colmeri* 15A3, a estirpe Bt L-7601 apresentou uma forte resistência à luz UV. Foi demonstrado que o pigmento produzido pela estirpe Bt L-7601 é um excelente agente protetor UV para proteínas inseticidas (CHEN et al., 2004).

3. PRODUÇÃO DE MELANINA

A produção de melanina em bactérias necessita que o meio de crescimento da cultura contenha fontes de carbono e nitrogênio suficientes. Existem diversas fontes de carbono, como glicose e frutose, e fontes de nitrogênio, como sulfato de amônio, L-triptofano e L-tirosina (BRUNKE et al., 2010; KIRAN et al., 2014; SHIVPRASAD; PAGE, 1989).

Em um estudo conduzido em cepas de leveduras *Candida glabrata*, o papel do oxigênio na pigmentação foi avaliado (BRUNKE et al., 2010). As células foram submetidas a um crescimento anaeróbico, onde o crescimento celular foi lento e não apresentou a produção de pigmento, mesmo após cinco dias de incubação. Quando o sobrenadante livre de células das culturas crescidas em ausência de oxigênio foi exposto em atmosfera normal, a pigmentação se tornou visível algumas horas depois. Este estudo concluiu que a *C. glabrata* secreta um precursor no meio, que reage na presença de oxigênio produzindo o pigmento (BRUNKE et al., 2010).

Neste estudo também foi descrito que a fonte de carbono influencia na produção do pigmento, sendo a glicose o substrato mais indicado.

Células da bactéria *Azotobacter chroococcum* 184 apresentaram uma intensidade da cor do pigmento aumentada e aceleração da melanização em presença de cobre (SHIVPRASAD; PAGE, 1989). Em presença de carvão e ácido benzoico a melanização foi inibida. Em presença de baixos níveis de ferro e altas taxas de aeração, a melanização foi acelerada, enquanto que em baixas taxas de aeração foi necessária alta quantidade de ferro. A melanização foi reprimida pela adição de hidróxido de amônio 14 mM, porém, a adição de cobre reverteu a repressão causada pelo hidróxido de amônio (SHIVPRASAD; PAGE, 1989).

3.1 ROTA DE SÍNTESE A PARTIR DA TIROSINA

A eumelanina é normalmente produzida em mamíferos a partir da tirosina e/ou DOPA pela ação da tirosinase (SODDU et al., 2004). Tirosinase é uma proteína

que contém cobre que catalisa duas reações diferentes: hidroxilação de monofenóis a o-difenois (atividade monofenolase) e oxidação de difenois a o-quinonas (atividade difenolase), ambos utilizando oxigênio molecular (SODDU et al., 2004). A tirosinase ajuda na conversão de tirosina à DOPA (KURIAN; BHAT, 2013). Tanto a tirosina como a DOPA são bons substratos para a tirosinase. Esta é a razão porque esta enzima foi e continua sendo a enzima de escolha para estudar a biossíntese da melanina *in vitro* (SODDU et al., 2004).

As tirosinases bacterianas podem ser divididas em cinco grupos, conforme sua organização e sua necessidade por uma proteína específica para atividade enzimática (ZAIDI et al., 2014).

Tirosinases tipo I requerem essa proteína auxiliar para secreção, para incorporação do cobre e atividade enzimática (ZAIDI et al., 2014). Tirosinases tipo II são enzimas monoméricas pequenas contendo apenas o domínio catalítico, similares em tamanho às do tipo I mas não requerem a proteína (KURIAN; BHAT, 2013; ZAIDI et al., 2014)

Tirosinases tipo III são semelhantes às tirosinases fúngicas, onde o domínio da tirosinase é seguido por uma extensão C-terminal que pode ser removida da enzima para estar totalmente ativa (ZAIDI et al., 2014). Tirosinases tipo IV são menores em tamanho que as outras e foram reportadas como ativas somente como homodímeros (KURIAN; BHAT, 2013).

As enzimas tipo V são similares às lacases e não tem ligações ao cobre A ou cobre B ou ligações ao oxigênio, comuns às tirosinases (KURIAN; BHAT, 2013).

3.2 ROTA DE SÍNTESE A PARTIR DO TRIPTOFANO

Experimentos conduzidos com *Candida glabrata* constataram que pigmentos foram produzidos apenas quando a fonte de nitrogênio foi o triptofano (BRUNKE et al., 2010). Quando fontes adicionais de nitrogênio foram adicionadas ao meio contendo triptofano, a pigmentação de *Candida glabrata* foi inibida em vários níveis, dependendo da fonte de nitrogênio adicionada. Não houve uma correlação clara entre o tipo de aminoácido (aromático, polar, apolar) e a redução da pigmentação.

Entretanto, quando o sobrenadante incolor das células de leveduras crescidas anaerobicamente com triptofano foi misturado com diferentes aminoácidos, a pigmentação se desenvolveu normalmente (BRUNKE et al., 2010). Não houve evidência de inibição da formação de pigmento no passo secundário dependente de oxigênio, com notável exceção da cisteína. Concluiu-se nesse estudo que a redução na formação de pigmentos no meio devido à presença de fontes adicionais de nitrogênio não é devido a um efeito inibitório no passo de reação secundário dependente de oxigênio, com possível exceção da cisteína (BRUNKE et al., 2010). Foi também mostrado que os pigmentos são formados como um subproduto do catabolismo do triptofano pela via de Ehrlich, e não por vias de metabolismo secundário, como no caso das melaninas fúngicas (BRUNKE et al., 2010)

4. ATIVIDADE BIOLÓGICA DA MELANINA

A melanina atua como um pigmento redox com capacidades de reduzir ou oxidar radicais oxigênio ou outros sistemas químicos redox. Além disso, ela também se liga a metais, com o qual pode mudar e gerar radicais hidroxil, o sistema redox mais prejudicial (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014). Também exibem funções biológicas secundárias ligadas a propriedades antioxidantes e desempenham um importante papel na interação entre os animais e o seu meio ambiente. Aumento nos níveis do hormônio concentrador de melanina são conhecidos como influenciadores da liberação de cortisol e portanto, a resposta ao stress em algumas espécies de peixes, reduzindo o nível de estresse nos animais (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014).

Cepas da bactéria *Burkholderia cenocepacia* C5424 produziram um pigmento melanina-like marrom e foi sugerido que a produção de melanina foi um fator que contribuiu para aumentar os níveis de colonização e persistência dessa subespécie (KEITH et al., 2007).

A melanina purificada de *Bacillus spp.* BTCZ31 inibiu as enzimas COX e LOX em altas concentrações (KURIAN; NAIR; BHAT, 2015). Neste estudo, a melanina desta estirpe na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mostrou 67,55% de atividade *scavenger*. Esta melanina também mostrou quase cem por cento de atividade de quelação de ferro (Fe^{2+}), o que reflete ainda sua capacidade de eliminar radicais livres. Níveis de nitrito celular, um indicador de NO produzido durante inflamação, foram reduzidos enquanto a concentração de melanina aumentava (KURIAN; NAIR; BHAT, 2015).

Células pigmentadas de fungos de *Candida glabrata* exibiram uma taxa de sobrevivência significativamente alta em meio de cultura contendo peróxido de hidrogênio em relação às células não pigmentadas, indicando que a pigmentação fornece resistência ao estresse oxidativo (BRUNKE et al., 2010). Estas células pigmentadas também sofreram danos menores causados por neutrófilos devido a presença de pigmento e tiveram sua patogenicidade aumentada para danificar células epiteliais da linha TR146 (BRUNKE et al., 2010).

Melaninas de diferentes fontes possuem uma série de funções antioxidantes, tais como atividade anti-HIV e atividade imunomoduladora (ZOU; ZHAO; HU, 2015). Estas funções prometem uma melanina natural com ótimo potencial de desenvolvimento como um corante alimentar seguro (ZOU; ZHAO; HU, 2015). Propriedades antioxidantes, especialmente atividades de eliminação de radicais, são muito importantes devido aos efeitos deletérios dos radicais livres em alimentos e sistemas biológicos (ZOU; ZHAO; HU, 2015). A formação excessiva de radicais livres acelera a oxidação dos lipídios em alimentos e induzem danos a biomoléculas adjacentes. O ensaio de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é o mais simples e preciso método para avaliar a capacidade de eliminar radicais de antioxidantes (ZOU; ZHAO; HU, 2015). Em uma solução de etanol, antioxidantes podem interagir com radical DPPH e transferir um elétron ou átomo de hidrogênio ao radical DPPH, neutralizando sua característica de radical livre (ZOU; ZHAO; HU, 2015).

Melaninas extraídas da *Exidia nigricans* apresentaram propriedades antioxidantes, antibacterianas e protetora de luz. A atividade antibacteriana foi comprovada contra *P. aeruginosa* e *E. faecalis* (ŁOPUSIEWICZ, 2018).

Em muitos microrganismos patogênicos a síntese de melanina está associada em virulência para animais e plantas (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014). Acredita-se que a melanina contribua para virulência microbiana por reduzir a suscetibilidade patogênica a mecanismos antimicrobianos dos hospedeiros e por influenciar a resposta imune do hospedeiro a infecção (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar bactérias isoladas de plantas de milho que produzam melaninas e realizar caracterizações bioquímicas e químicas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a produção de melanina de 17 isolados bacterianos de plantas de milho e analisar quantitativamente as melaninas através de técnicas de espectroscopia no UV-visível;
- Selecionar a partir do ensaio anterior os 4 principais produtores de melanina dentre os isolados;
- Avaliar por curva de crescimento por 7 dias as culturas das bactérias selecionadas: pH, produção de melanina, crescimento celular (DO_{600}) e produção de proteínas; e determinar o melhor tempo para a produção de melanina
- Extrair e purificar as melaninas das bactérias selecionadas;
- Analisar a melanina extraída dos isolados selecionados através de espectroscopia no infravermelho (IV) e no ultravioleta-visível (UV-vis) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliar a proteção das células em exposição a luz UV em meio de cultura contendo melanina comparada ao meio de cultura sem melanina (ausência de L-triptofano no meio de cultura)
- Avaliar a atividade antioxidante da melanina para o radical DPPH

6. METODOLOGIA

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho sendo o *Rhizobium tropici* (BR322) a bactéria utilizada como padrão na triagem e o *Azospirillum brasilense* (HM053) a bactéria utilizada como padrão em todos os outros ensaios. Estas bactérias isoladas de plantas de milho pertencem à Coleção de Culturas de Bactérias do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas CCET – Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás (UEG) e o *Azospirillum brasilense* foi cedido pela Universidade Federal do Paraná (UFPR).

6.2 ARMAZENAMENTO E MANUTENÇÃO DAS BACTÉRIAS

As bactérias foram cultivadas em placa de Petri contendo os meios batata, TY (*tryptone yeast*) ou YM (*yeast mannito*) sólidos (Anexo I).

As culturas foram inoculadas de maneira estriada para verificação da pureza e incubadas em estufa bacteriológica à 28 °C por 48 horas sendo utilizado os antibióticos ácido nalidíxico (10 µg mL⁻¹) e cloranfenicol (20 µg mL⁻¹) como marcadores para os isolados, pois as bactérias são tolerantes a estes, evitando contaminações.

O crescimento bacteriano foi monitorado em meio líquido por determinação da densidade ótica à 600 nm (DO₆₀₀) em espectrofotômetro e foi realizada contagem de unidades formadoras de colônia pela técnica de espalhamento com alça de Drigalski (HOWIESON; DILWORTH, 2016). As culturas com DO₆₀₀ entre 0,6 a 1 foram transferidas para microtubos e submetidas à centrifugação de 13.000 rpm por 5 minutos. O sedimento das células foi lavado em solução salina estéril 0,9% e foi adicionada solução de glicerol estéril 30%. Após a adição do glicerol, as células

foram armazenadas à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estes materiais foram estocados em duplicata para a realização dos estudos.

6.3 TRIAGEM DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE MELANINA

As 17 bactérias utilizadas na etapa de triagem que visualmente apresentaram produção de pigmentos (MT8, MT10, MT22, MT23, MT26, MT29, MT30, MT31, MT34, MT39, MT40, MT41, MT43, MT45, MT51, MT70 e MT75) e o BR322, utilizado como padrão de referência na triagem, foram inoculadas para crescimento utilizando 1 mL de meio batata líquido suplementado com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) ou L-tirosina (5 mmol L^{-1}) para cada poço da placa de 96 poços (DeepWell®), em agitador orbital, à $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 140 rpm por 168 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e obtido a média e o desvio padrão. A partir da análise dos dados de densidade ótica em 400 nanômetros (DO_{400}) foi possível estimar a quantidade de melanina que cada bactéria produziu.

Para cálculo de concentração de melanina em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foi utilizada melanina comercial sintética (Sigma-Aldrich®). Foi preparada uma solução estoque de melanina na concentração de $500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em hidróxido de sódio (NaOH) 3 M e foram realizadas diluições para 12,5, 25,0, 50,0 e 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em NaOH 3 M. Foi realizada leitura no comprimento de onda de 400 nm para determinação da concentração da melanina e com os resultados obtidos com as diluições do padrão de melanina (Sigma-Aldrich®) foi elaborada uma curva de calibração, calculada a equação da reta e realizada a regressão linear (CABRERA-VALLADARES et al., 2006).

As bactérias estudadas foram classificadas arbitrariamente como baixa produção ($5\text{ a }40\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), média produção ($40\text{ a }100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), alta produção ($100\text{ a }150\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) e produção muito alta (maior que $150\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) de pigmento marrom/preto.

Das bactérias avaliadas foram selecionadas 4 estirpes com a maior produção de pigmento para os testes posteriores.

6.4 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE MELANINA

As amostras selecionadas foram cultivadas em triplicata em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio batata suplementado com 5 mmol L⁻¹ de L-triptofano por 7 dias no escuro, sendo os erlenmeyers cobertos com papel alumínio. As amostras foram inoculadas no meio de cultura imediatamente antes de serem colocadas no agitador orbital à 28 °C e 140 rpm. Coletas de 3,0 mL foram realizadas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após incubação. As amostras foram coletadas em cada tempo pré-estabelecido e congeladas em freezer a -20 °C para as análises posteriores.

A avaliação do pH das amostras foi realizada utilizando tiras de pH (Merck®). Todas as amostras coletadas foram lidas em espectrofotômetro a 600 nm para avaliação do crescimento bacteriano. Após, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos para separação da massa bacteriana e utilizado o sobrenadante para leitura em 400 nm para avaliação da produção de pigmento (BRUNKE et al., 2010; CABRERA-VALLADARES et al., 2006; PITHAWALA; JAIN, 2013). A estimativa da quantificação da produção de pigmentos melanina-like (semelhantes as melaninas) foi realizada mediante a confecção de uma curva de calibração com o padrão de melanina comercial sintética (Sigma-Aldrich®) nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg mL⁻¹.

6.4.1 Análise de proteínas

Foi utilizado o método de Bradford (1976) para análise de proteínas totais nas amostras para acompanhamento da curva. Para a elaboração da curva de calibração foi utilizada uma solução de albumina bovina sérica (BSA) nas concentrações 2, 5, 10, 20 e 30 µg mL⁻¹.

As amostras de cada tempo de coleta das culturas foram tratadas com adição de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M (1:1), por 15 minutos para a hidrólise proteica. As amostras assim tratadas foram utilizadas para as dosagens e lidas a 595 nm em espectrofotômetro Biospectro SP-220. A quantificação foi realizada utilizando a curva de BSA como descrito acima, sendo os ensaios realizados em triplicatas.

6.4.2 Contagem de células e biomassa

Pré-inóculos frescos das amostras selecionadas foram cultivados em meio batata sem L-triptofano em agitador orbital, à 28 °C e 140 rpm. Alíquotas de 1 mL de cada amostra foram adicionadas, individualmente, a 10 mL de meio batata sem L-triptofano e cultivadas em agitador orbital, à 28 °C e 140 rpm por 24 horas. A densidade ótica das amostras foi avaliada em espectrofotômetro Biospectro SP-220 a 600 nm. Após este período, diluições foram realizadas até a obtenção de diluição 10^{-6} , utilizando água destilada estéril. Uma alíquota de 100 μL de cada diluição 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram inoculadas em placa de Petri contendo meia força de LA (Luria Bertani Ágar), utilizando alça de Drigalski. De 24 a 36 horas após a inoculação na placa as colônias se tornaram visíveis e foram contadas e o resultado expresso em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Para este estudo foi considerado o limite mínimo de 15 UFC e como limite máximo 150 UFC por placa para a contagem de células. As UFC mL^{-1} foram calculadas utilizando a fórmula (GUERRA, 2016):

$$\text{Resultado} = \text{média} \times \frac{1}{\text{nível de diluição}} \times \frac{1}{\text{voluma da alíquota}}$$

Para a determinação da biomassa das bactérias, estas foram crescidas em meio batata como descrito acima e depois transferidas para tubo falcon de 50 mL, previamente pesado, e centrifugado a 6.000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi lavado 3 vezes com solução salina 0,85%. Após as lavagens, o tubo falcon contendo o precipitado foi colocado para secar em estufa a 40 °C por 12 horas e após a secagem, pesado e a biomassa calculada em mg mL^{-1} de meio.

6.5 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PIGMENTOS

MELANINA-LIKE

Para a extração das melaninas dos isolados selecionados e da bactéria controle (*A. brasilense* HM053) foram utilizadas as metodologias descritas por WHITTAKER (1963) e KURIAN et al. (2015) com modificações.

O pellet total de células foi separado do sobrenadante através de centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado ácido tricloroacético 5%, éter-álcool (1:1 [vol/vol]) e éter puro para precipitação da melanina e remoção das impurezas. A esta solução foi adicionado carbonato de sódio 0,1 M e levada ao banho maria 100 °C por 10 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada por 60 minutos a 6.000 rpm, sendo que o material insolúvel foi descartado e a solução resultante foi mantida em estufa para secagem à 70 °C por 7 dias, até que fosse obtido o resíduo seco (WHITTAKER, 1963). Esta amostra foi considerada como o extrato de melanina e utilizada para os demais ensaios.

6.5.1 Análise de espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros na região IV foram obtidos a partir das melaninas purificadas e secas, conforme descrito por CHÁVEZ-BÉJAR et al. (2013) sendo a melanina comercial sintética (Sigma-Aldrich®) utilizada como padrão de referência.

O espectro na região IV foi desenvolvido com a melanina extraída de cada bactéria a temperatura ambiente, sendo que estas foram maceradas e dispersas em KBr na proporção 1:100, e então, pressionadas a 10 tons para a confecção das pastilhas. Para análise destas, foi utilizado o espectrômetro Perkin Elmer Spectrum com resolução de 16 acumulações.

6.5.2 Análise de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis)

O espectro obtido na região UV-vis foi realizado com as melaninas purificadas e secas, sendo preparada uma solução estoque de cada amostra de melanina na concentração de 2 mg mL⁻¹ em hidróxido de sódio 3 M. Esta solução estoque foi diluída em água destilada nas concentrações de 1 e 8 µg mL⁻¹. Foi utilizado espectrofotômetro Perkin Elmer UV WinLab e a varredura foi feita de 200 nm a 600 nm. A melanina comercial sintética (Sigma-Aldrich®) foi utilizada como padrão de referência (GILL; VON HIPPEL, 1989).

6.5.3 Análise de atividade de proteção celular

A atividade de proteção celular foi avaliada com a presença da melanina em meio batata e avaliada a proteção contra os raios UV a partir do sobrenadante do cultivo dos isolados bacterianos. Foram utilizadas 6 bactérias: os isolados MT29, MT34, MT41 e MT70, e as bactérias HM053 (*A. brasilense*) como controle positivo e HB101 (*E. coli*) como controle negativo visto não ser produtora de pigmentos melanina-*like*. As bactérias foram cultivadas em meio batata com L-triptofano e sem L-triptofano em agitador orbital, à 28 °C e 140 rpm por 48 horas. Foi coletada uma alíquota e determinado a densidade ótica em 600 e 400 nm. Foram utilizadas diluição (1:10) para melhor distribuição das células em placa de Petri estéril utilizando uma alíquota de 2 mL e adicionado 18 mL de solução salina (0,9%) estéril. A contagem de células foi realizada antes e após a exposição por 20 minutos em raios UV germicida e determinado a UFC's pela técnica da microgota para todas as bactérias testadas. Pela determinação da DO em 400 nm das culturas bacterianas foi possível estimar a presença dos pigmentos no sobrenadante utilizando uma curva de calibração com melanina sintética comercial (Sigma-Aldrich®).

6.5.4 Análise de atividade antioxidante para radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

A atividade antioxidante para radical DPPH foi avaliada a partir das melaninas purificadas e secas, e analisado conforme descrito por KURIAN et al. (2015) com modificações, sendo o hidroxitolueno butilado (BHT) utilizado como padrão de referência. Uma solução estoque de cada melanina foi preparada em DMSO 10% para concentração final de 1 mg mL⁻¹. A partir dessa solução, alíquotas foram adicionadas ao radical DPPH 20 µg mL⁻¹ em etanol 95%. As amostras foram agitadas vigorosamente e mantidas no escuro por 30 minutos. Foi utilizado espectrofotômetro Perkin Elmer UV WinLab e a leitura foi realizada em 517 nm, utilizando etanol 95% como branco. Os ensaios foram realizados em triplicata e utilizado a média para construção dos gráficos.

Segue a fórmula para cálculo da atividade antioxidante:

$$\% \text{ scavenging} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

Onde:

A_0 = absorvância em 517 nm da solução de DPPH 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em etanol 95%

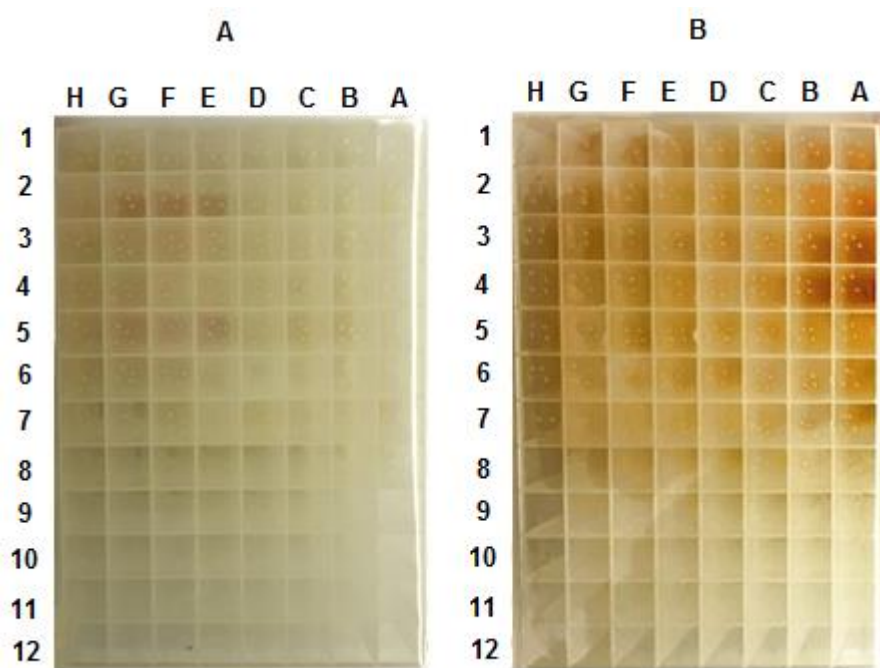
A_1 = absorvância em 517 nm da solução de DPPH 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ adicionada da solução de melanina nas diferentes concentrações

A_2 = absorvância em 517 nm da solução de melanina em etanol 95%

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas para a triagem 17 bactérias endofíticas isoladas de raiz de plantas de milho, quanto a capacidade de produção de pigmentos relacionados à melanina (*melanina-like*). Estas foram cultivadas em meio batata líquido contendo L-triptofano (5 mmol L^{-1}) e L-tirosina (5 mmol L^{-1}), sendo que estes dois compostos são aminoácidos conhecidos como precursores de pigmentos do tipo *melanina-like* (SODDU et al., 2004). Através da avaliação dos isolados bacterianos foi possível observar inicialmente de forma visual as diferenças de coloração entre as culturas no tempo de 168 horas (Figura 5) que passou de incolor para amarela ou marrom.

Figura 5 – Meio batata suplementado com A- L-tirosina (5 mmol L^{-1}) e B- L-triptofano (5 mmol L^{-1}) na placa DeepWell® após crescimento bacteriano e de melanina no escuro em agitador orbital, a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 140 rpm após 168 horas de incubação. A-1, B-1, C-1: MT8; D-1, E-1, F-1: MT10; G-1, H-1, A-2: MT22; B-2, C-2, D-2: MT23; E-2, F-2, G-2: MT26; H-2, A-3, B-3: MT29; C-3, D-3, E-3: MT30; F-3, G-3, H-3: MT31; A-4, B-4, C-4: MT34; D-4, E-4, F-4: MT39, G-4, H-4, A-5: MT40; B-5, C-5, D-5: MT41; E-5, F-5, G-5: MT43; H-5, A-6, B-6: MT 45; C-6, D-6, E-6: MT51; F-6, G-6, H-6: MT70; A-7, B-7, C-7: MT75; D-7, E-7, F-7: BR322; G-7, H-7, A-8, B-8, C-8, D-8: Controle negativo



Como controle do ensaio para produção de melanina foi utilizado o meio batata sem suplementação de L-triptofano e L-tirosina nas mesmas condições onde não foi constatado o aparecimento de coloração no meio após 168 horas.

Foi observado visualmente que a coloração ficou mais intensa no meio batata suplementado com L-triptofano que no meio batata suplementado com L-tirosina. Essa coloração mais intensa de cor amarronzada pode estar associada à produção de pigmentos melanina-*like* pelas bactérias.

A partir deste ensaio foram realizadas as detecções em espectrofotômetro da densidade celular (DO_{600}) e a presença de pigmentos melanina-*like* (DO_{400}) para estimar a quantidade para cada isolado.

Foi possível constatar por estas avaliações que houve uma preferência dos isolados pela utilização de L-triptofano e uma menor utilização de L-tirosina como precursor para a produção de pigmentos. Este resultado pode indicar que as vias de síntese das bactérias testadas isoladas podem ser diferentes das utilizadas por outros organismos como fungos, animais e plantas. Nestes organismos, já é conhecido que preferem utilizar L-tirosina como precursor para produção de pigmentos marrom escuros, sendo considerados pigmentos relacionados a melanina (melanina-*like*) (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014).

Pela análise da DO_{400} do sobrenadante das culturas foi possível obter a partir da curva de calibração com a melanina sintética Sigma-Aldrich® os valores estimados para pigmentos melanina-*like* das amostras testadas na presença dos dois precursores (Tabela 1).

Foi possível observar que na ausência tanto de L-tirosina como L-triptofano no meio de cultura batata nenhum isolado foi capaz de produzir pigmento marrom.

Tabela 1 – Avaliação estimada da produção de melanina em meio batata suplementado com L-triptofano (5 mmol L⁻¹) e meio batata suplementado com L-tirosina (5 mmol L⁻¹) no escuro em agitador orbital, a 28 °C e 140 rpm por 168 horas utilizando espectrofotometria em 400 nm. DP – desvio padrão de triplicata

Amostra	Melanina (µg mL ⁻¹) (DP)	
	Meio batata + L-triptofano	Meio batata + L-tirosina
MT8	42,39 (± 1,01)	47,69 (± 1,66)
MT10	5,73 (± 0,92)	9,24 (± 2,89)
MT22	49,80 (± 3,41)	77,27 (± 4,38)
MT23	6,38 (± 0,21)	6,14 (± 0,62)
MT26	28,91 (± 1,64)	65,19 (± 0,41)
MT29	136,26 (± 3,93)	38,94 (± 2,09)
MT30	11,08 (± 0,90)	21,62 (± 3,30)
MT31	45,43 (± 1,52)	18,76 (± 4,52)
MT34	214,36 (± 3,54)	60,52 (± 2,40)
MT39	32,21 (± 2,87)	66,74 (± 2,09)
MT40	17,39 (± 3,28)	24,89 (± 4,55)
MT41	173,64 (± 2,63)	115,96 (± 2,53)
MT43	22,39 (± 4,20)	42,66 (± 1,89)
MT45	43,46 (± 6,19)	35,49 (± 3,00)
MT51	30,96 (± 1,77)	44,83 (± 0,72)
MT70	157,57 (± 4,04)	33,02 (± 1,64)
MT75	81,86 (± 0,25)	88,11 (± 4,55)

Pela análise dos dados foi convencionado arbitrariamente limites de produção de acordo com os valores obtidos. Assim as bactérias foram consideradas como de baixa produção de melanina entre 5 a 40 µg mL⁻¹, de média produção de 40 a 100 µg mL⁻¹, alta produção entre 100 e 150 µg mL⁻¹ e muito alta produção maior que 150 µg mL⁻¹.

Utilizando L-triptofano como precursor no meio de cultivo, e considerando os limites de produção, foi calculada a proporção dos isolados quanto à produção sendo que 47,06% foi considerado de baixa produção, 29,42% de média produção, 5,88% de alta produção e 17,64% de produção muito alta.

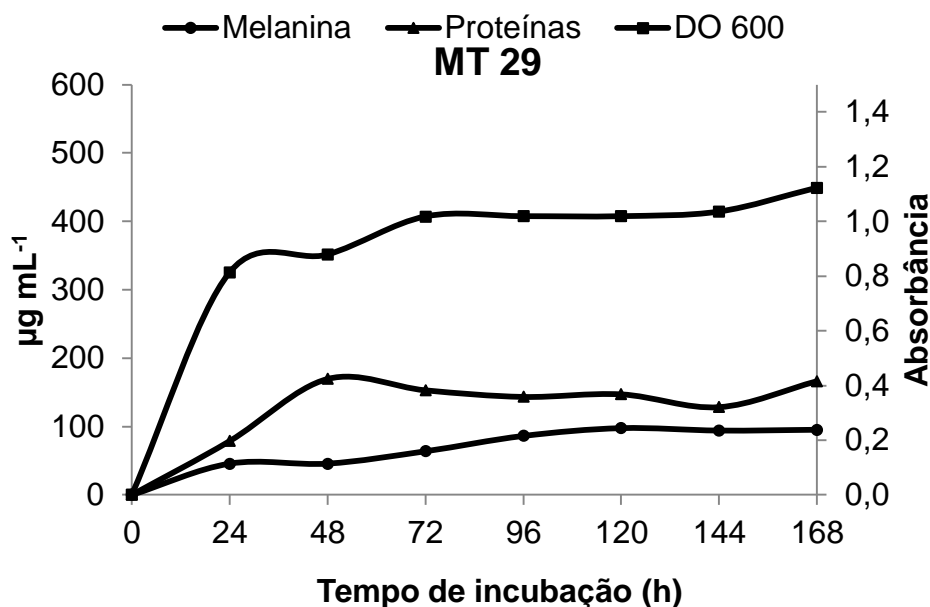
Já com a utilização da L-tirosina no meio de cultivo, a maioria dos isolados foram considerados de baixa e média produção, cada um com 47,06%, e apenas 1 estirpe foi considerada de alta produção.

A partir dos resultados obtidos foram selecionados os isolados MT29, MT34, MT41 e MT70 cultivados em meio batata + L-triptofano, visto que estes apresentaram os valores mais altos indicando capacidade de produção de melanina-*like* nas condições testadas.

Os isolados selecionados MT29, MT34, MT41 e MT70, foram utilizados para a determinação da curva de crescimento e de produção do pigmento para otimização do ensaio, sendo a estirpe HM053 de *Azospirillum brasilense* utilizada como padrão de referência.

O isolado MT29 apresentou crescimento bacteriano similar ao das demais bactérias, alcançando uma DO_{600} de 1,12 em 168 horas (Figura 6, Anexo II, Tabela 6). Este isolado estagnou seu crescimento bacteriano em torno das 72 horas até as 144 horas e foi possível constatar um aumento da DO no último ponto de coleta (Figura 6, Anexo II, Tabela 6). O isolado MT29 apresentou produção de melanina média de $66 \mu\text{g mL}^{-1}$ no período do ensaio (Figura 6, Anexo II, Tabela 4). Foi possível observar que a elevação da produção do pigmento ocorre até 120 horas ($97,63 \mu\text{g mL}^{-1}$) e que após este período há uma estabilização da produção, permanecendo neste mesmo patamar até a última coleta (Figura 6, Anexo II, Tabela 4). A média de produção de proteínas foi de $123,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ sendo que o pico foi observado com 48 horas ($169,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 6, Anexo II, Tabela 5).

Figura 6 – Bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e crescimento celular (DO_{600}) do isolado MT29 ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 140 rpm no escuro

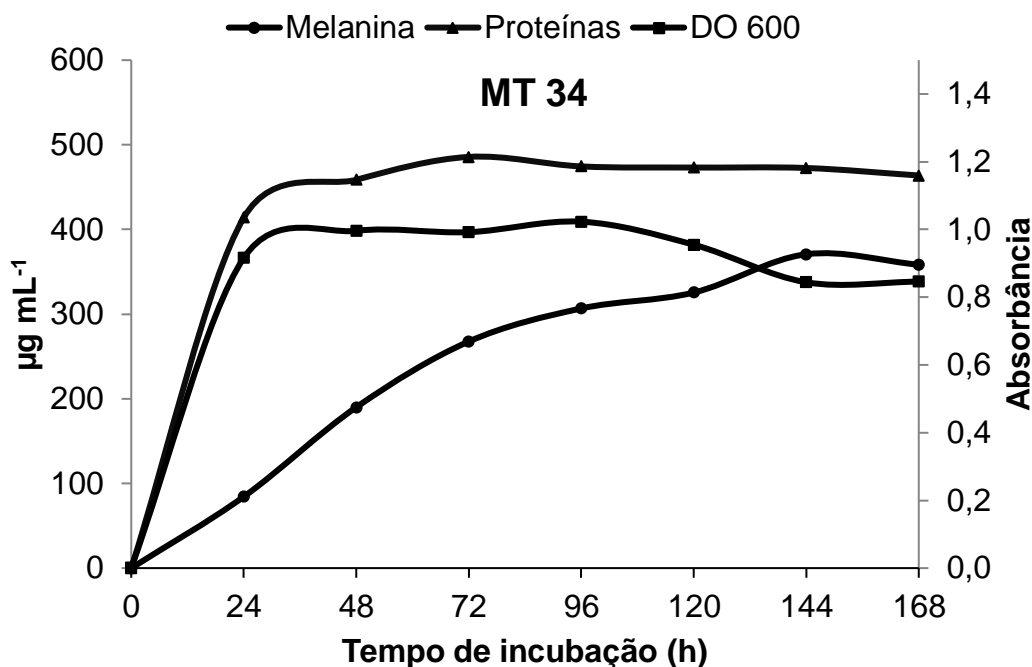


Comparando as variáveis analisadas para o isolado MT29, parece não haver uma correlação direta entre elas e o conteúdo de proteínas (Figura 6, Anexo II, Tabela 5). O pico de produção de proteínas foi observado com 48 horas, e para o crescimento celular e para a presença do pigmento o maior valor ocorreu com 120 horas (Figura 6, Anexo II, Tabelas 4, 5 e 6). O teor de proteínas e o crescimento apresentaram um pequeno aumento com 168 horas de coleta, mas estes podem indicar lise celular, o que aumenta a densidade ótica e também as proteínas dissolvidas no meio de cultura (Figura 6, Anexo II, Tabelas 4, 5 e 6). Este comportamento é comum em bactérias que apresentam crescimento rápido e que já apresentam um período de declínio com este tempo final de coleta (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Dentre as bactérias testadas o isolado MT29 apresentou as menores médias na produção do pigmento e de proteínas, o que pode indicar que esta não é uma bactéria promissora para produção de pigmentos nas condições testadas.

O isolado MT34 apresentou uma produção média de melanina com $237,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os períodos de coleta com pico a 144 horas ($370,73 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 7, Anexo II, Tabela 4). Os valores médios da DO_{600} indicaram um crescimento

exponencial com 24 horas sendo o platô em 120 horas. A partir deste período começou a entrar em declínio nos últimos dois tempos de coleta (Figura 7, Anexo II, Tabela 6). Foi observado para este isolado que a produção de melanina se iniciou em 24 horas e dobrou em 48 horas, sendo que o aumento da produção foi mais lento a partir deste tempo e aumentou 95% entre 48 horas e 144 horas, e no último tempo de coleta houve uma pequena diminuição de 3,3% da presença do pigmento (Figura 7, Anexo II, Tabela 4). Observando o teor de proteínas totais, a concentração média foi de $405,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ ao longo das 168 horas. A concentração das proteínas aumentou inicialmente e se manteve praticamente constante, sendo que o pico de concentração foi observado com 72 horas de crescimento (Figura 7, Anexo II, Tabela 5).

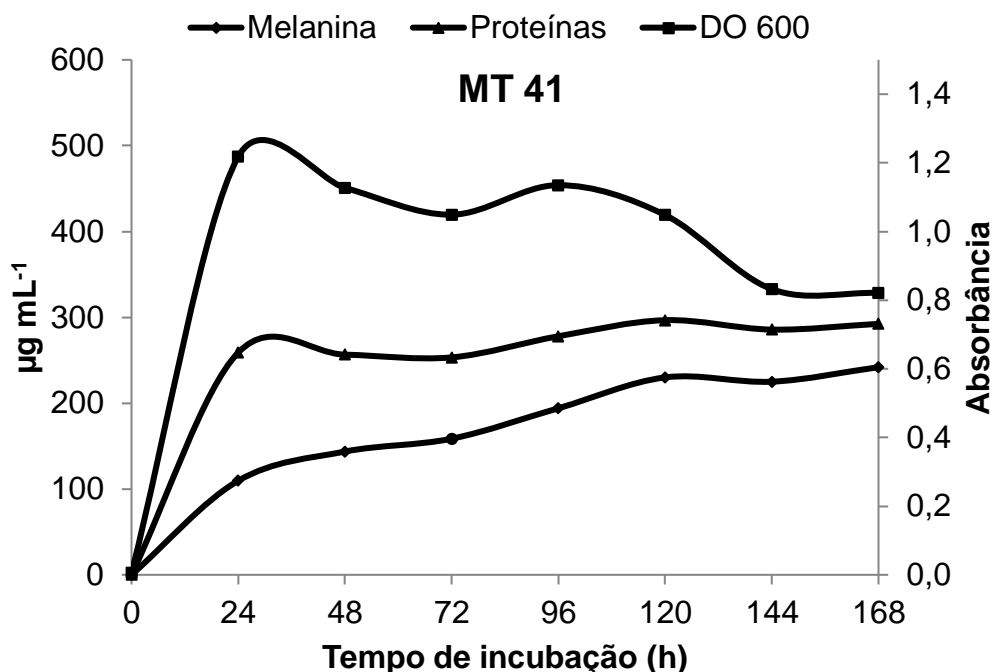
Figura 7 – Bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e crescimento celular (DO_{600}) do isolado MT34 ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 140 rpm no escuro



É interessante notar que mesmo havendo um aumento da produção de pigmento não houve grande alteração tanto no crescimento da célula quanto no teor de proteínas (Figura 7, Anexo II, Tabelas 4, 5 e 6).

Pela curva de crescimento a estirpe MT41 foi considerada uma bactéria de crescimento rápido, pois em 24 horas já atingiu o pico de densidade celular (Figura 8, Anexo II, Tabela 6). A partir das 48 horas entrou em declínio de crescimento (Figura 8, Anexo II, Tabela 6). Quanto a produção de melanina, a média obtida foi de $162,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ havendo uma produção gradativa desde às 24 horas e o pico só ocorreu às 168 horas ($241,9 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Figura 8 – Bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e crescimento celular (DO_{600}) do isolado MT41 ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 140 rpm no escuro



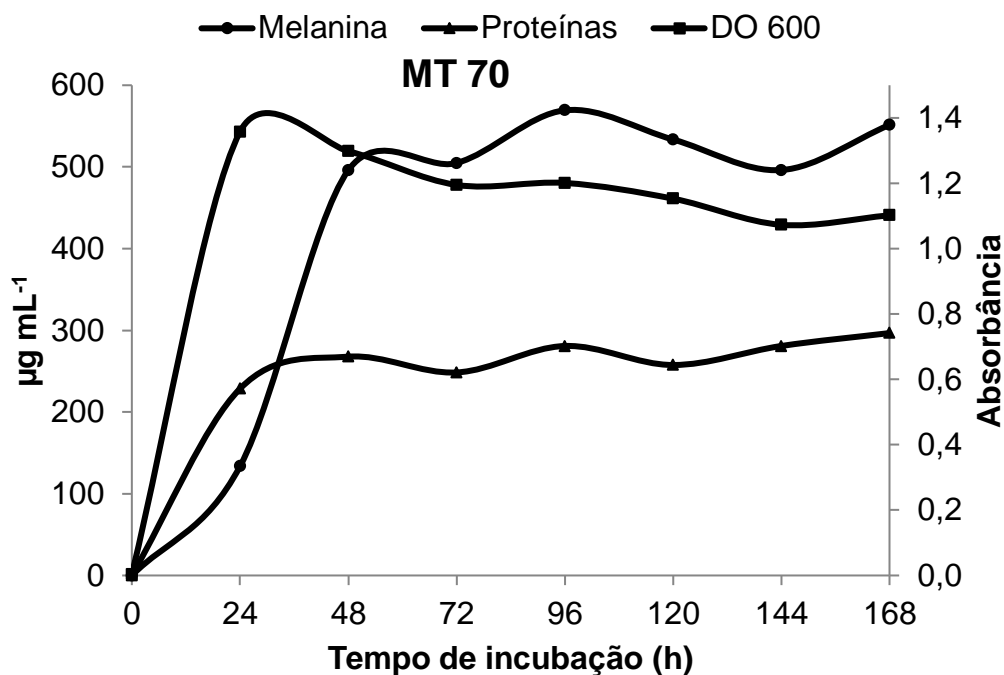
O teor médio de proteína no meio do cultivo foi de $240,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ sendo observado que das 24 horas de crescimento até as 120 horas a variação do conteúdo proteico foi mínimo, e que a partir das 144 horas houve um decréscimo (Figura 8, Anexo II, Tabela 5).

Pela observação do crescimento, o isolado MT70 foi considerado de crescimento rápido, pois com 24 horas já atingiu o patamar superior e manteve poucas alterações da densidade celular até às 168 horas (Figura 9, Anexo II, Tabela 6). Este isolado MT70 apresentou os maiores valores quanto a produção de melanina dentre as bactérias selecionadas com média de $410,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ no período avaliado (Figura 9, Anexo II, Tabela 4). Foi observada a presença de pigmento já com 24 horas, mas com 48 horas o aumento foi bem expressivo, com aumento de 370% (Figura 9, Anexo II, Tabela 4).

A quantidade se manteve neste patamar, sendo o pico obtido com 96 horas de crescimento com $569,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 9, Anexo II, Tabela 4). A produção de proteínas média foi de $232,62 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que variou de $228,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ com 24

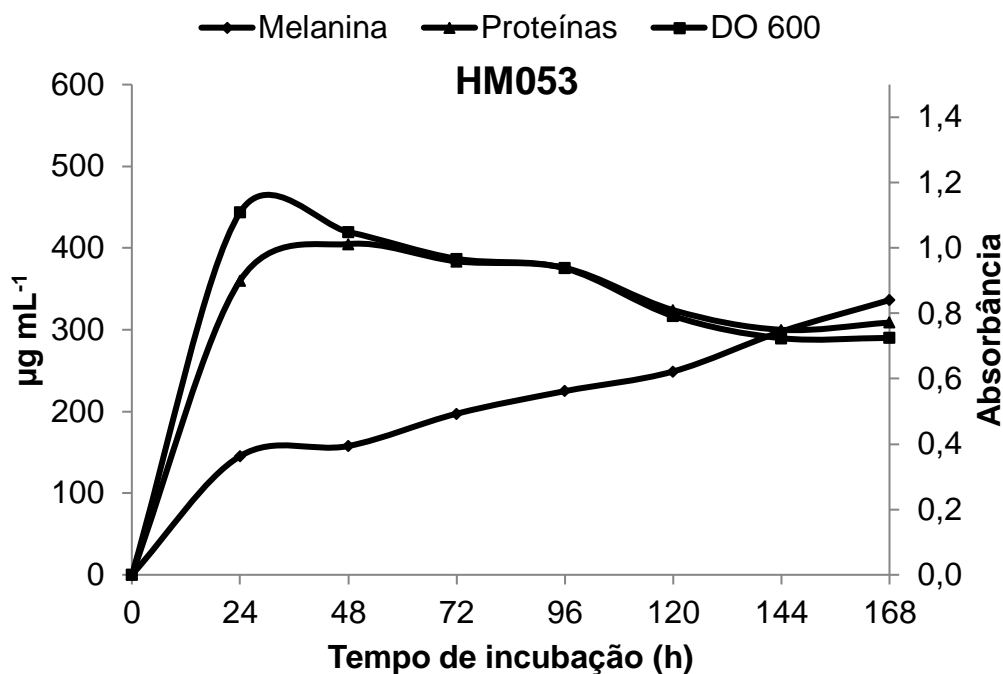
horas de crescimento até $296,68 \mu\text{g mL}^{-1}$ com 168 horas, sendo este último o pico para esta variável (Figura 9, Anexo II, Tabela 5).

Figura 9 – Bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e crescimento celular (DO_{600}) do isolado MT70 ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 140 rpm no escuro



A curva de crescimento bacteriano para o isolado HM053 foi exponencial com 24 horas, chegando ao pico neste período (Figura 10, Anexo II, Tabela 6). A partir daí houve um decréscimo discreto até o último tempo de coleta. A produção média de melanina para a estirpe HM053 apresentou $200,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ no período avaliado, sendo o pico observado no último tempo de coleta com a produção de melanina-like de $336,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 10, Anexo II, Tabela 4). A observação de proteínas solúveis no meio de crescimento desta estirpe indicou o pico máximo com 48 horas ($404,85 \mu\text{g mL}^{-1}$), com decréscimo a partir deste tempo até 144 horas e um pequeno aumento na última coleta ($308,73 \mu\text{g mL}^{-1}$), que pode ser devido a lise celular (Figura 10, Anexo II, Tabela 5).

Figura 10 – Bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$), proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e crescimento celular (DO_{600}) da estirpe HM053 ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 140 rpm no escuro

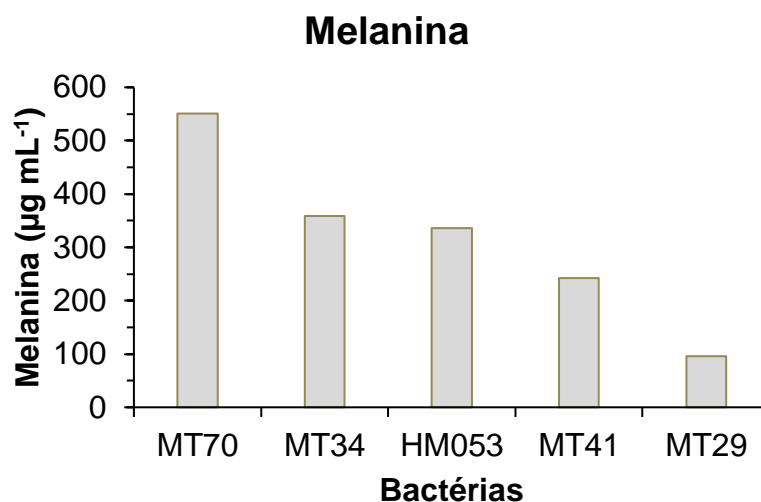


Considerando a produção média de melanina no período de 168 horas de produção, comparativamente, foi possível ordenar da maior para a menor produção: MT70, MT34, HM053, MT41 e MT29 (Figura 11). A variação quantitativa foi em torno de 47% entre os isolados MT70, MT34 e a estirpe controle HM053. Já comparando a MT70 com a MT41, esta última apresentou uma produção média 61% menor (Figura 11).

O isolado MT29 foi observado como o de menor produção do pigmento melanina-*like* sendo em torno de 6 vezes menor a produção do que a MT70 (Figura 11).

Assim, pelos resultados, a média de produção de pigmentos melanina-*like*, considerando as 4 bactérias isoladas de milho selecionadas, foi de $219,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, muito próximo da concentração obtida para a bactéria HM053 (*Azospirillum brasilense*), usada como controle, indicando que a seleção inicial foi eficiente para a detecção de bactérias produtoras deste pigmento.

Figura 11 – Média de bioprodução de melanina-like ao final de 168 horas de incubação dos isolados MT29, MT34, MT41, MT70 e HM053 em meio batata suplementado com L-triptofano (5 mmol L^{-1}), cultivadas em agitador orbital à 140 rpm no escuro



CHEN et al. (2004) quantificou a melanina produzida pela estirpe Bt L-7601 de *Bacillus thuringiensis* subesp. *dendrolimus* em diferentes meios de cultura sem a adição de L-tirosina ou um análogo, e em 19 horas a estirpe produziu $257,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ no meio NB. Comparando com os resultados obtidos, os isolados produziram uma quantidade menor com 24 horas de incubação com a adição de L-triptofano. O isolado MT34 produziu $84,36 \mu\text{g mL}^{-1}$, o isolado MT41 produziu $109,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, o isolado MT70 produziu $133,76 \mu\text{g mL}^{-1}$, o isolado MT29 $45,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a estirpe HM053 produziu $145,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ neste tempo (Anexo II, Tabela 4).

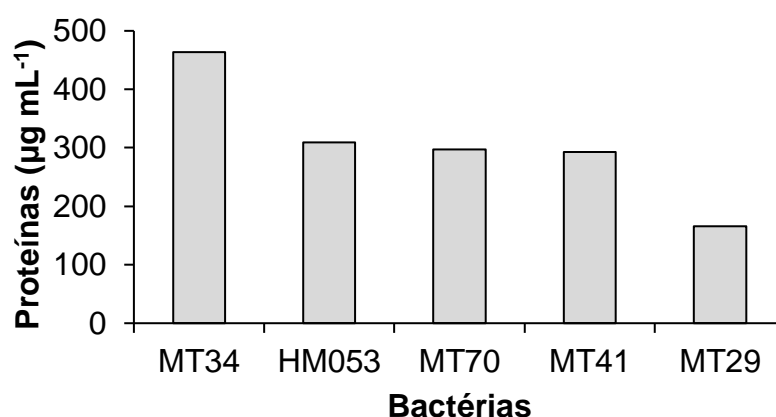
SANTOS e STEPHANOPOULOS (2008) reportaram a bioprodução de melanina por *Escherichia coli* modificada geneticamente. Com a suplementação de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de L-tirosina em meio M9, a produção de melanina de *E. coli* K12 com genes mutados $\Delta\text{pheA } \Delta\text{tyrR}$ foi de aproximadamente $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 48 horas, e em 96 horas, essa quantidade aumentou para $380 \mu\text{g mL}^{-1}$. Com a suplementação de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ de L-tirosina, a produção de melanina em 48 horas foi de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$, e em 96 horas teve um pequeno aumento para aproximadamente $210 \mu\text{g mL}^{-1}$ indicando a eficiência no incremento de produção com a suplementação de L-tirosina como precursora de melanina (SANTOS; STEPHANOPOULOS, 2008).

Em nosso estudo, os cultivos foram realizados em meio batata suplementado com $240,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de L-triptofano. Nesta condição o isolado MT70 produziu $495,96 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 48 horas, mais que o dobro que a bactéria *E. coli* K12 biotecnologicamente transformada. Outra observação feita é que as bactérias estudadas podem possuir outra via de produção de melanina-*like*, pois utilizam L-triptofano em vez de L-tirosina que é estudada como o mais comum precursor (KOKJOHN; SCHRADER, 2000; SAJJAN et al., 2010; VASANTHABHARATHI; LAKSHMINARAYANAN; JAYALAKSHMI, 2011). Esta observação destaca a importância do estudo da variação natural presente na diversidade de microrganismos no Cerrado.

Pela avaliação o pH das amostras no período do ensaio variou de 6,0, pH inicial, a aproximadamente pH 9,0 no final. Com 24 horas de cultivo, o pH já se elevou para 8,0 em todas as bactérias estudadas (Anexo II, Tabela 7).

Observamos que o isolado MT34 foi o maior produtor de proteínas totais, seguido do HM053, MT70 e MT41, que tiveram uma produção similar entre si (Figura 12). Já o isolado MT29 apresentou a produção média mais baixa de proteínas totais (Figura 12).

Figura 12 – Média de bioprodução de proteínas totais de bactérias isoladas de milho e *A. brasilense* em 168 horas de incubação em meio batata suplementado com L-triptofano



Em todos os isolados, foi observado que a quantidade de proteínas totais em 24 horas foi similar a quantidade apresentada ao final de 168 horas. Exceto para MT29, que a quantidade praticamente dobrou entre 24 e 168 horas, mas ainda foi

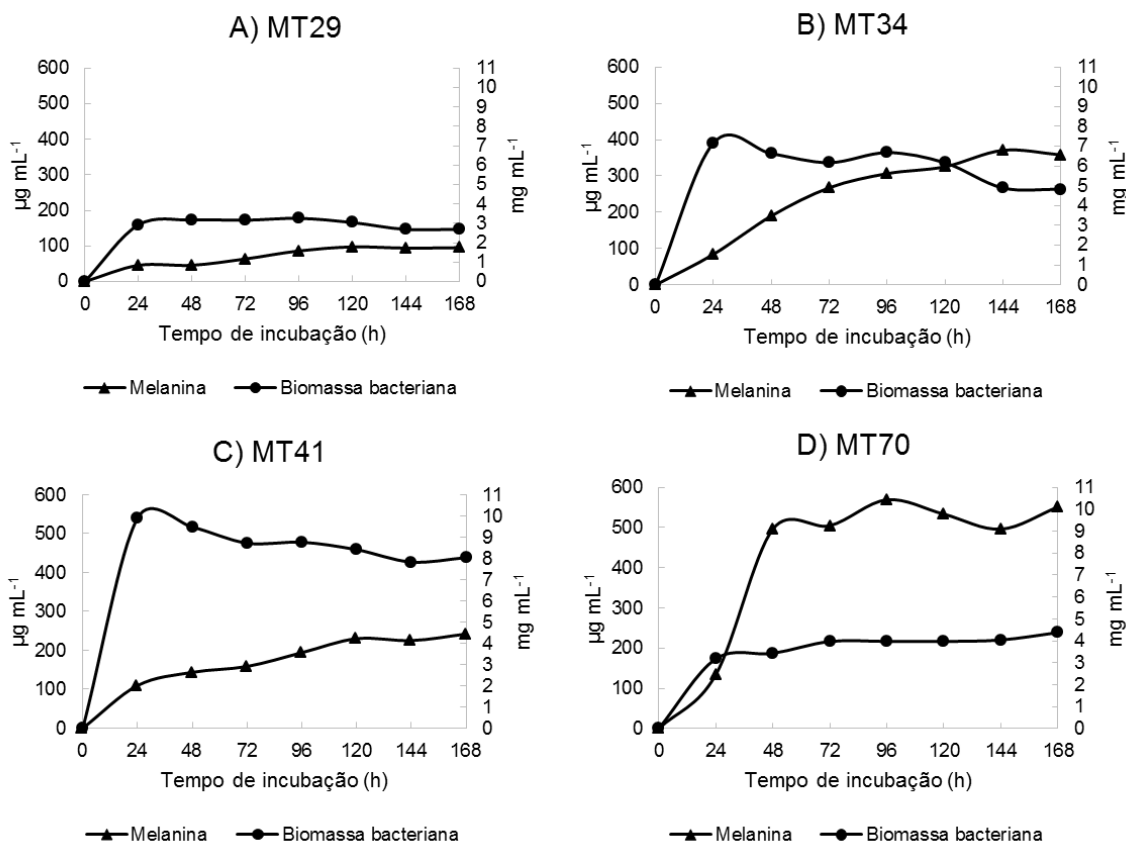
baixa quando comparada com as demais bactérias estudadas. A estirpe HM053 apresentou um pico de produção de proteínas totais em 48 horas e depois um pequeno decaimento entre 48 e 168 horas, apresentando ao final das 168 horas uma quantidade menor que a apresentada em 24 horas (Figura 12).

A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) estimada a partir da DO_{600} foi realizada em meio batata sem suplementação para as amostras isoladas da raiz de milho e foi calculado número de UFC mL^{-1} e biomassa bacteriana após 24 horas de cultivo.

Os resultados obtidos demonstram que o isolado MT34 apresentou uma biomassa semelhante à obtida para a estirpe MT70 mesmo que a UFC mL^{-1} do isolado MT70 tenha sido bem superior a da MT34. O isolado MT41 foi o que apresentou a maior biomassa bacteriana enquanto o isolado MT29 apresentou a menor. Estes dados foram utilizados para estimar a biomassa bacteriana das amostras avaliadas durante o período de 168 horas.

A estirpe MT29 foi a menor bioprodutora de melanina das estirpes estudadas, com bioprodução de $95,25 \mu g mL^{-1}$ ao longo de 168 horas, sendo também a que apresentou a menor biomassa bacteriana, mesmo apresentando uma DO_{600} mediana em relação as demais estirpes (Figura 13-A). A diferença entre a biomassa bacteriana e os dados de densidade celular são devido à morfologia das células bacterianas, que variam em tamanho e formato de um isolado para o outro (JACKMAN, 2012).

Figura 13 – Biomassa bacteriana (mg mL^{-1}) e bioprodução de melanina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ao longo de 168 horas de incubação em meio batata com L-triptofano (5 mmol L^{-1}) em agitador orbital à 28°C e agitação de 140 rpm no escuro dos isolados MT29, MT34, MT41 e MT70



O isolado MT34 teve a segunda maior bioprodução de melanina com $358,35 \mu\text{g mL}^{-1}$ ao longo de 168 horas, apresentando biomassa bacteriana mediana em relação ao apresentado pelos isolados estudados (Figura 13-B).

O isolado MT41 teve a segunda menor bioprodução de melanina com $241,92 \mu\text{g mL}^{-1}$ ao longo de 168 horas, apresentando biomassa bacteriana mediana em relação ao apresentado pelas estirpes estudadas (Figura 13-C).

O isolado MT70 teve a maior bioprodução de melanina com $551,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ ao longo de 168 horas, e biomassa bacteriana mediana dentre as estirpes estudadas (Figura 13-D). Estes dados indicam que a eficiência da produção de melanina-like pela estirpe MT70 é maior que as demais bactérias estudadas, pois

mesmo com esses dados medianos, ela se apresentou como a bioprodutora de melanina mais promissora.

Foi possível observar que o isolado MT70 apresentou a maior eficiência na bioprodução do pigmento, pois mesmo com menos UFC mL⁻¹ e com menor biomassa bacteriana, a estirpe foi capaz de apresentar a maior quantidade de pigmento marrom (Figura 13-D).

Kiran et al. (2014) reportaram a produção de melanina da estirpe *Nocardiosis alba* MSA10 em função do tempo de incubação e da biomassa bacteriana com suplementação de L-tirosina ao meio de cultura. Observamos que a biomassa bacteriana aumentou ao longo do tempo de incubação, o que não aconteceu para as nossas amostras, visto que todas apresentaram crescimento muito rápido, e em 24 horas já apresentavam valores de densidade celular em seu pico, apresentando pouca variação de 24 a 168 horas. Porém, a quantidade de pigmento, tal como relatado por Kiran et al. (2014) aumentou ao longo do período de incubação para todas as amostras estudadas.

As análises de espectroscopia no IV e espectrofotometria UV-vis foram realizadas com a melanina extraída seca isolada das bactérias selecionadas. Pela análise foram obtidos os espectrogramas no IV de todas as amostras testadas (Anexo III, Figuras 23, 24, 25, 26, 27 e 28), onde observamos algumas bandas de absorção que também estão presentes na melanina padrão da Sigma-Aldrich® (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise dos picos de absorção na região do infravermelho da melanina com determinação dos grupos funcionais das bactérias isoladas de milho e da bactéria controle *A. brasilense* HM053

Grupos funcionais	Melaninas					
	MT29	MT34	MT41	MT70	HM053	Sigma-Aldrich
O-H ou N-H	3390	3435	3440	3424	3439	3387
C-H de grupos aromáticos	3006	3005	3006	3005	2963	N.O.
C=O ou N-H	1668	1668	1674	1675	1668	1718
C=C	N.O.	N.O.	1535	1546	1549	N.O.
C-N	1352	1353	1354	1354	1352	1288
O-H fora do plano	941	942	942	942	934	N.O.
C-H de anéis aromáticos	834	834	834	834	833	784
C-H de anéis aromáticos	680	688	687	685	688	629

N.O.: Não observado

As melaninas apresentaram estiramentos vibracionais no espectro de IV muito parecidos. A banda relacionada na região de 3650 e 3200 cm^{-1} característica de O-H ou N-H, foi identificada para todas as melaninas testadas, que variou de 3387 a 3435 cm^{-1} (Tabela 2). Os valores desta primeira banda estão em conformidade com o reportado por MBONYIRYIVUZE et al. (2015) para melanina de *Sepia officinalis* que reportou 3422 cm^{-1} para esta banda, e por CENTENO e SHAMIR (2008) que reportaram 3375 cm^{-1} também para melanina de *Sepia officinalis*. BANERJEE et al. (2014) reportaram 3435 cm^{-1} para esta banda encontrada em melanina extraída de *Azotobacter chroococcum*, similar ao encontrado pelas melaninas analisadas.

As frequências observadas entre 3050 e 3010 cm^{-1} podem ser atribuídas a C-H de grupos aromáticos com estiramento C-H sp^2 . (PAVIA et al., 2010). Neste estudo foram observadas nas melaninas bandas com uma frequência um pouco

menor, 3005 cm^{-1} , exceto para HM053 que apresentou esta banda em 2963 cm^{-1} , estiramento característico de C-H de grupos alifáticos (PAVIA et al., 2010).

Estiramentos entre 1850 e 1630 cm^{-1} são representativos de C=O (PAVIA et al., 2010). Foram observadas nas amostras estiramentos nessa faixa que variaram de 1668 a 1675 cm^{-1} . Estes valores estão similares aos reportados por CENTENO e SHAMIR (2015) de 1642 cm^{-1} . BANERJEE et al. (2014) reportaram a presença desta banda em 1716 cm^{-1} , indicando a presença de grupo C=O de ácido carboxílico/éster.

As bandas de estiramento C=C em anéis aromáticos normalmente aparecem entre 1600 e 1450 cm^{-1} (PAVIA et al., 2010). Todas as melaninas apresentaram esta banda, que variou de 1535 a 1549 cm^{-1} , exceto para as melaninas obtidas das estirpes MT34 e MT29, a qual não apresentou essa banda. A melanina comercial Sigma-Aldrich® também não apresentou absorção nesta região. BANERJEE et al. (2014) reportaram a banda característica de C=C em 1622 cm^{-1} .

As melaninas das estirpes isoladas apresentaram estiramentos vibracionais entre 1352 e 1354 cm^{-1} . A melanina comercial apresentou absorção em 1288 cm^{-1} . Estes estiramentos podem indicar a presença de C-N, que aparecem em espectro IV entre 1350 e 1000 cm^{-1} (PAVIA et al., 2010).

Estiramentos na região de $935 \pm 15\text{ cm}^{-1}$ estão atribuídos como deformações O-H fora do plano. As melaninas testadas apresentaram bandas nessa região de 934 a 941 cm^{-1} . CENTENO e SHAMIR (2008) observaram uma frequência em 958 cm^{-1} e atribuíram à deformação O-H fora do plano em melanina obtida de *Sepia officinalis*. A melanina comercial Sigma-Aldrich® também não apresentou absorção nesta região.

Dobramentos fora do plano de =C-H de anéis aromáticos ocorrem entre 900 e 690 cm^{-1} (PAVIA et al., 2010). Nas melaninas testadas foram observados estiramentos em 834 cm^{-1} e $680-688\text{ cm}^{-1}$. Estes resultados corroboram com os encontrados por CENTENO e SHAMIR (2015) que reportaram estiramento em 838 cm^{-1} e 667 cm^{-1} . A melanina comercial Sigma-Aldrich® apresentou absorção em 784 e 629 cm^{-1} .

Pela análise por espectrofotometria UV-vis foi constatado que os espectros entre as melaninas analisadas apresentaram semelhanças e variações de acordo

com a bactéria avaliada, mas algumas pequenas diferenças. Preliminarmente podemos supor que os pigmentos têm características de melanina e que, portanto, todas apresentaram este pigmento. É também possível supor que estas bactérias possuem características químicas das melaninas um pouco diferente entre si, podendo haver pigmentos que não foram descritos ainda.

O espectrograma da região do UV-vis da melanina-*like* da estirpe HM053 (Figura 14) e das demais melaninas apresentaram elevação da absorção nas regiões de 280 e 330 nm, conforme aumento na concentração da melanina. Comparativamente, foi observada semelhança no espectro UV-vis entre as melaninas produzidas pelos isolados analisados e a melanina comercial Sigma-Aldrich® (Figura 15). Melanina extraída de *Azotobacter chroococcum* por BANERJEE et al. (2014) apresentou um espectro UV-vis diferente das melaninas utilizadas neste estudo, o que pode ter ocorrido devido a presença de vários tipos de melaninas obtidas na extração do pigmento produzido por *Azotobacter chroococcum*.

Figura 14 – A) Espectro de absorção da região do UV-vis para a melanina extraída da estirpe HM053 nas concentrações (- - -) 0,001 mg mL⁻¹ e (---) 0,008 mg mL⁻¹ em água. B) Insert mostrando a região de 215 a 350 nm

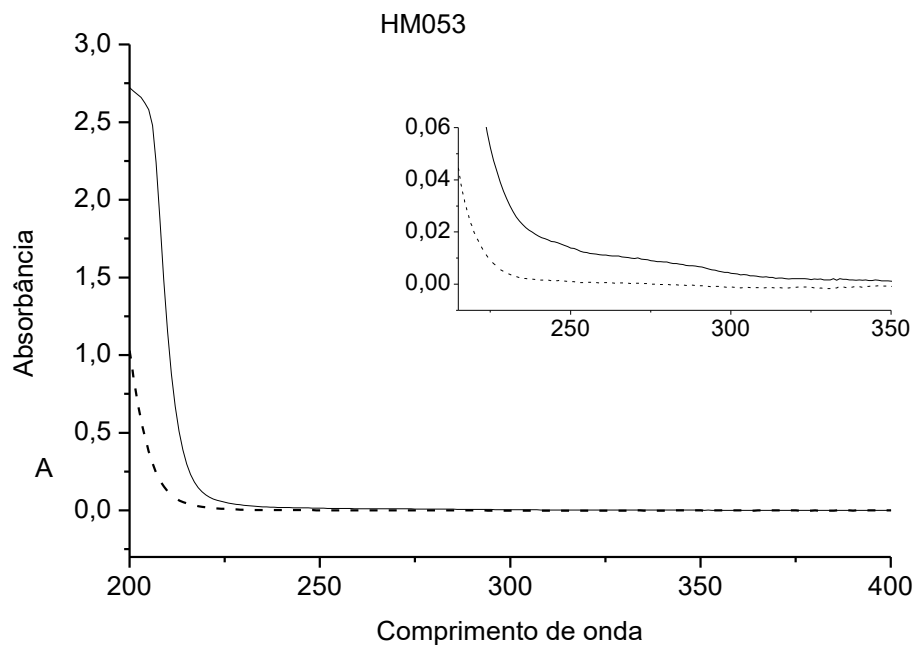
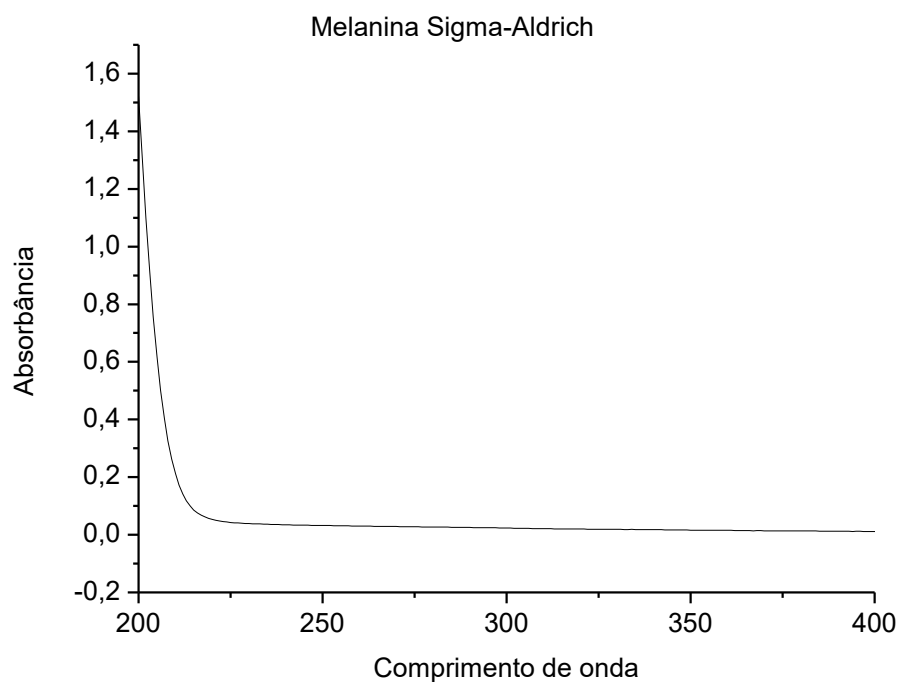


Figura 15 – Espectro de absorção da região do UV-vis para a melanina Sigma-Aldrich®

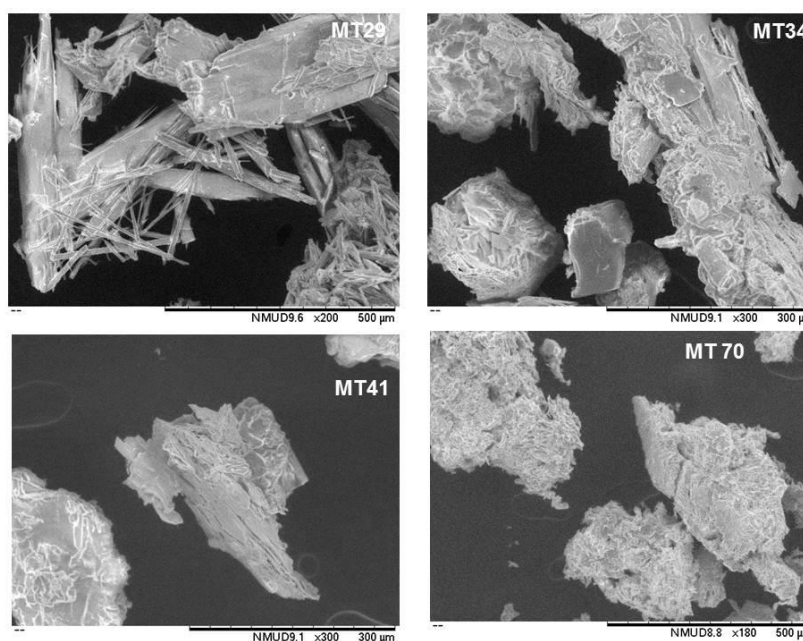


Foi constatado que os espectros entre as melaninas analisadas apresentaram semelhanças e variações de acordo com a bactéria avaliada. Assim pelos dados obtidos podemos supor que os pigmentos marrons possuem características de melanina. É também possível supor que estas bactérias possuem características químicas dos pigmentos marrons tipo melanina um pouco diferentes entre si, podendo haver pigmentos que não foram descritos ainda.

A caracterização morfológica da superfície dos pigmentos marrons obtidos após o processo de extração foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o equipamento TM3030 Plus, *Tabletop Microscope*, Hitachi. As imagens foram feitas em diferentes aumentos, sendo observado diferença entre os pigmentos das bactérias isoladas quanto ao formato e dimensões do pigmento marrom melanina-*like* das amostras MT29, MT34 MT41 e MT70 (Figura 16).

O pigmento marrom extraído da amostra MT29 (Figura 16) apresenta aglomerados amorfos de diferentes dimensões. Algumas partes são lisas, outras parecem ser porosas. Cristais em formato de agulhas de diferentes espessuras, aglomeradas ou não, podem ser observados.

Figura 16 – Caracterização morfológica da superfície dos pigmentos marrons produzidos pelas bactérias MT29, MT34, MT41 e MT70 obtidas pela técnica de MEV



O pigmento marrom extraído da amostra MT34 apresenta aglomerados amorfos em diferentes dimensões. A maioria dos aglomerados são totalmente amorfos e quase não aparecem superfícies lisas nos aumentos menores mas no aumento maior é possível observar que há fases lisas e parecem se dispor em camadas (Figura 16)

O pigmento marrom extraído da amostra MT41 (Figura 16) apresenta um aglomerado de grande dimensão e amorfo e outros aglomerados totalmente amorfos de diferentes dimensões e espessuras. Os aglomerados parecem ser porosos e partes lisas não são visualizadas.

O pigmento marrom extraído da amostra MT70 (Figura 16) apresenta aglomerados de dimensão menor. Os aglomerados parecem porosos e com superfície rugosa, mas algumas partes lisas são observadas.

Através das micrografias dos pigmentos obtidos pelos diferentes isolados, observamos muitos aglomerados amorfos de diferentes dimensões, algumas pequenas esferas, sendo que algumas são lisas, outras porosas. Somente a micrografia do pigmento da estirpe MT29 que apresentou alguns cristais em formato de agulhas com algumas partes lisas e outras porosas. PRADOS-ROSALES et al. (2015) analisaram melanina extraída de *Auricularia auricula* por MEV e a micrografia mostrou que o pó era composto de uma mistura de fragmentos amorfos com uma distribuição de tamanho variando entre 1 e 50 μm .

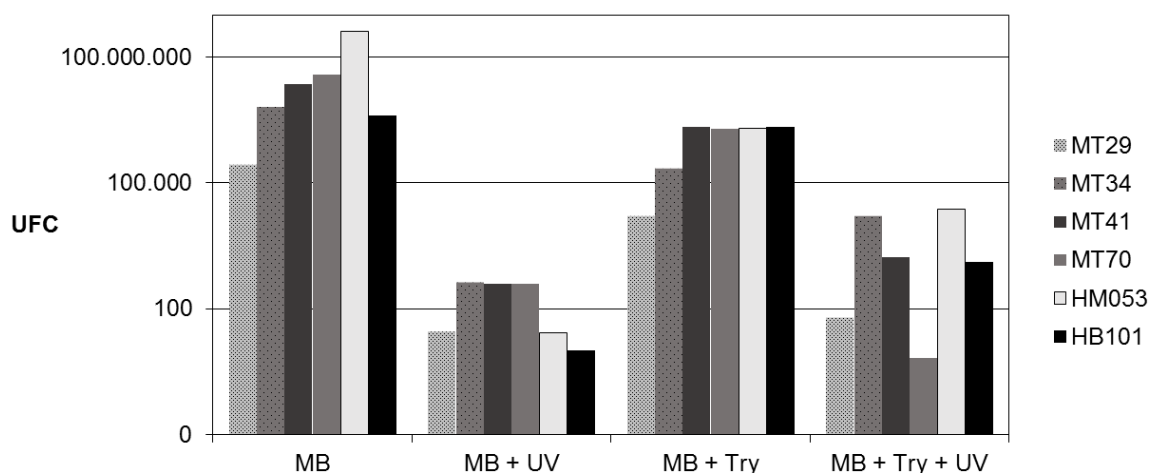
TARANGINI e MISHRA (2013) analisaram melanina purificada obtida por *Pseudomonas sp* por MEV e sugeriram que o material era um depósito amorfo sem estruturas diferenciáveis, assim como os pigmentos avaliados neste estudo. EL-NAGGAR e EL-EWASY (2017) utilizaram MEV para avaliar a estrutura da melanina sintetizada por *Streptomyces glaucescense* e o que parecem ser pequenas esferas foram identificadas e partes amorfas também foram observadas.

MBONYIRYIVUZE et al. (2015b) reportou micrografias de melanina comercial de *Sepia officinalis* obtida da Sigma-Aldrich® com diferentes grânulos esféricos aglomerados em diferentes dimensões. LIU e SIMON (2003) examinaram melaninas de *Sepia officinalis* isoladas e purificadas por diversos métodos e constataram que os pigmentos possuíam dimensões e superfícies distintas, dependentes do método

de extração utilizado, com agregados esféricos porosos ou lisos, e com maior ou menor facilidade de deformação.

Efeitos deletérios de radiação UV variam em diferentes regiões do espectro e a melanina inibe estes efeitos induzidos pelo UV em vários caminhos. Não apenas absorvendo ou refletindo a luz em diferentes comprimentos, mas efetivamente capturando espécies reativas de oxigênio. O espectro da radiação UV é dividido em três regiões de acordo com o comprimento de onda: UVA (400 – 320 nm), UVB (320 – 280 nm) e UVC (<280 nm) (GENG et al., 2008b). As amostras expostas a luz UVC germicida (comprimento de onda de 254 nm) durante 20 minutos tiveram incidência de uma dose de $6.997,2 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Pela análise da atividade de proteção celular constatamos que a ausência de L-triptofano, e conseqüentemente do pigmento no meio de cultura refletiu em um crescimento maior do número de células para todas as estirpes (Figura 17). A presença do L-triptofano no meio de cultivo, em todas as bactérias testadas, parece levar a bactéria a uma adaptação metabólica evidenciada ou estresse, principalmente para HM053, onde foi observado um número de UFC's muito maior no meio com ausência de L-triptofano, do que no meio contendo L-triptofano (Figura 17).

Figura 17 – Avaliação da atividade de proteção celular com a presença do pigmento marrom em meio batata (MB) e a proteção contra os raios UV a partir do sobrenadante do cultivo dos isolados bacterianos MT29, MT34, MT41, MT70, HM053 (*A. brasilense*) e HB101 (*E. coli*) em meios com e sem triptofano (Try). UFC – Unidades Formadoras de Colônia



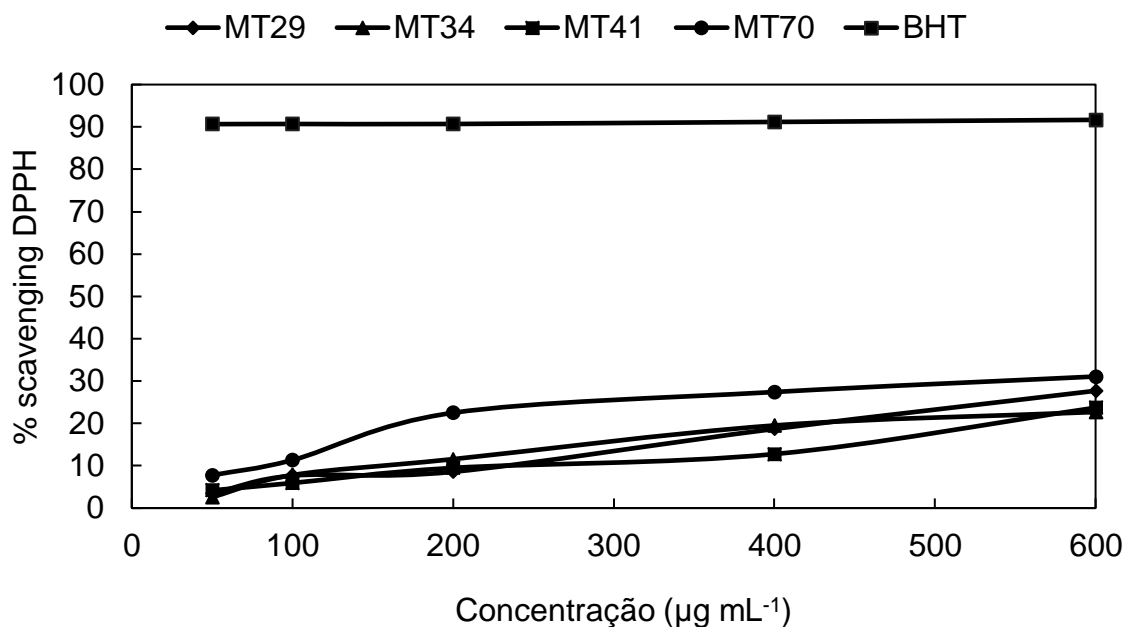
Constatamos que a incidência de raios UV promoveu morte celular em maior proporção no meio sem L-triptofano e sem o pigmento, e que a presença de L-triptofano e do pigmento marrom melanina-*like* protegeu as células de um modo geral. Apenas para o isolado MT70 com L-triptofano, o pigmento parece não ter um efeito eficiente na proteção celular. Para as demais estirpes o crescimento com L-triptofano e a produção do pigmento marrom melanina-*like* nas amostras expostas aos raios UV parece ter um efeito de citoproteção (Figura 17).

De modo geral a taxa de mortalidade das células foi maior sem L-triptofano no meio de crescimento e ausência de produção de pigmento marrom quando estas foram expostas a luz UV indicando que a presença do pigmento foi determinante como fator de proteção ao dano oxidativo deste comprimento de luz (Figura 17).

Propriedades antioxidantes, especialmente atividade de captura de radicais livres, são muito importantes devido ao efeito destrutivo dos radicais livres em sistemas biológicos e alimentos (ZOU; ZHAO; HU, 2015). Em solução de etanol, os antioxidantes podem interagir com o radical DPPH e transferir um elétron ou um átomo de hidrogênio ao radical DPPH, neutralizando seu radical livre (HERCHI; KALLEL; BOUKHCHINA, 2014). A atividade de captura do radical DPPH foi realizada com o pigmento marrom tipo melanina em concentrações de 50 a 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a atividade aumentou conforme a concentração aumentava (Figura 18).

O pigmento obtido da amostra MT70 obteve os melhores resultados apresentando 31,07% de atividade em 30 minutos, porém essa atividade foi muito menor se comparada com a atividade do BHT, o composto utilizado como padrão neste ensaio, visto que o BHT é um antioxidante conhecido. O BHT em baixa concentração teve um poder antioxidante superior às melaninas analisadas por esta metodologia (Figura 18).

Figura 18 – Atividade antioxidante para o radical DPPH das melaninas produzidas pelas estirpes MT29, MT34, MT41 e MT70 comparadas ao BHT em concentrações de 50 a 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após 30 minutos em repouso no escuro



ZOU et al. (2015) avaliou a atividade antioxidante de melanina extraída de fungos *Auricularia auricula*, e após 30 minutos no escuro, a melanina apresentou aproximadamente 80% de atividade para o radical DPPH. Neste estudo também foi demonstrado que o aumento da concentração da melanina resultou em aumento de atividade, e a análise foi feita até $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, porém os pigmentos deste estudo saturaram em DMSO 10% em concentrações acima de $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ZOU; ZHAO; HU, 2015).

TARANGINI e MISHRA (2013) avaliaram a atividade antioxidante de melanina extraída de *Pseudomonas sp* por até 72 horas. Foi verificado que $44,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ de melanina apresentou sua atividade antioxidante até 48 horas, não sendo de rápida atividade como reportado por outros autores. Já utilizando $14,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ de melanina foi observado mais de 70% de atividade antioxidante para o radical DPPH em 72 horas. Como neste estudo a atividade antioxidante para o radical DPPH da melanina foi avaliada somente por 30 minutos, outros testes devem ser conduzidos até 48 horas para verificar a totalidade da atividade antioxidante apresentada por estas melaninas (TARANGINI; MISHRA, 2013).

As melaninas bioproduzidas pelas bactérias isoladas de plantas de milho presentes no Cerrado goiano foram extraídas do meio de cultura batata através de um método eficiente, permitindo que uma caracterização físico-química e bioquímica fosse realizada. Estes pigmentos representam uma substância de fonte natural que poderiam ser utilizados na formulação de bioprodutos como protetores solares, tintas, tecidos, proteção de superfícies contra os raios UV, e outros, porém testes adicionais para conhecimento da sua estrutura ainda devem ser realizados.

8. CONCLUSÃO

Foram identificados e avaliados 17 isolados bacterianos obtidos de raiz de plantas de milho e selecionados 4 isolados que apresentaram a capacidade de produzir pigmentos marrons tipo melanina em maior quantidade: os isolados MT29, MT34, MT41 e MT70.

As melaninas foram quantificadas por dados de espectrofotometria no UV-visível comprovando a bioprodução dos pigmentos pelas estirpes isoladas. A estirpe MT29 apresentou a menor produção dentre as estirpes selecionadas e a MT70 se mostrou como a mais promissora fonte do pigmento marrom nas condições de produção estudadas.

Os pigmentos estudados se mostraram semelhantes através da análise de espectrofotometria no IV em relação a melanina sintética comercial da Sigma-Aldrich®, bem como através da análise no UV-vis com varredura entre 200 e 400 nm, sendo um indicativo que estes pigmentos podem ser considerados melanina-*like*.

Pela avaliação dos pigmentos extraídos dos 4 isolados estudados por MEV, foi possível a visualização das superfícies dos pigmentos secos sendo observados para os pigmentos tipo melanina as características gerais de superfícies amorfas de diferentes dimensões, formas e espessuras e apresentaram diferenças para os pigmentos de cada bactéria, podendo indicar que estes são diferentes.

Os pigmentos produzidos apresentaram atividade de proteção das células frente aos raios UVC, pois o número de UFC mL⁻¹ na presença do pigmento foi maior que o esperado na ausência do pigmento. A análise da atividade antioxidante dos pigmentos foi avaliada e considerada de baixa atividade contra o radical DPPH no período de 30 minutos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2016. **Cancer Facts & Figures 2016**, p. 1–9, 2016.

BANERJEE, A.; SUPAKAR, S.; BANERJEE, R. Melanin from the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter chroococcum*: A spectroscopic characterization. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

BRENNER, M.; HEARING, V. J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochem Photobiol.**, v. 84, n. 3, p. 539–549, 2008.

BRUNKE, S. et al. *Candida glabrata* tryptophan-based pigment production via the Ehrlich pathway. **Molecular Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 25–47, 2010.

CABRERA-VALLADARES, N. et al. Expression of the melA gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 6, p. 772–779, 2006.

CARLETTI, G.; NERVO, G.; CATTIVELLI, L. Flavonoids and melanins: A common strategy across two kingdoms. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1159–1170, 2014.

CENTENO, S. A.; SHAMIR, J. Surface enhanced Raman scattering (SERS) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art. **Journal of Molecular Structure**, v. 873, n. 1-3, p. 149–159, 2008.

CHÁVEZ-BÉJAR, M. I. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to optimize melanin synthesis from glucose. **Microbial cell factories**, v. 12, p. 108, 2013.

CHEN, Y. et al. Characterization of melanin produced by a wild-type strain of *Bacillus thuringiensis*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 50, n. 1, p. 183–188, 2004.

CUBO, M. T. et al. Melanin production by *Rhizobium* strains. **Applied and**

Environmental Microbiology, v. 54, n. 7, p. 1812–1817, 1988.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. DE O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. [s.l: s.n.].

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. [s.l: s.n.].

EL-NAGGAR, N. E.; EL-EWASY, S. M. anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, 2017.

GENG, J. et al. Photoprotection of bacterial-derived melanin against ultraviolet A-induced cell death and its potential application as an active sunscreen. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, n. 7, p. 852–858, 2008a.

GENG, J. et al. Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 1151–1155, 2008b.

GILL, S. C.; VON HIPPEL, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n. 2, p. 319–326, 1989.

GÓMEZ-MARÍN, A. M.; SÁNCHEZ, C. I. Thermal and mass spectroscopic characterization of a sulphur-containing bacterial melanin from *Bacillus subtilis*. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, n. 31-32, p. 1576–1580, 2010.

GUERRA, F. Métodos de contagem microbiana. p. 5–9, 2016.

HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The Dark Side of the Mycelium: Melanins of Phytopathogenic Fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 37, p. 447–471, 1999.

HERCHI, W.; KALLEL, H.; BOUKHCHINA, S. Physicochemical properties and antioxidant activity of Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera L.*) oil as affected by different extraction methods. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 464–470, 2014.

HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. **Working with rhizobia**. Canberra: ACIAR,

2016.

JACKMAN, J. The Microbe: The Basics of Structure, Morphology, and Physiology as They Relate to Microbial Characterization and Attribution. In: CLIFF, J.B., KREUZER, H.W., EHRHARDT, C.J., WUNSCHHEL, D. S. (Ed.). . **Chemical and Physical Signatures for Microbial Forensics**. [s.l: s.n.]. p. 13–34.

KEITH, K. E. et al. *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 9057–9065, 2007.

KIRAN, G. S. et al. Melanin-templated rapid synthesis of silver nanostructures. **Journal of nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2014.

KOKJOHN, T. A.; SCHRADER, J. O. **Isolated melanin-like substance and method for producing the same**, 2000.

KURIAN, N.; BHAT, S. G. Bacterial melanins. **Microbial Products**, v. 1, p. 97–110, 2013.

KURIAN, N. K.; NAIR, H. P.; BHAT, S. G. Evaluation of anti-inflammatory property of melanin from marine *Bacillus spp.* BTCZ31. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 3, p. 251–255, 2015.

LIU, Y.; SIMON, J. D. The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis*. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 1, p. 72–80, 2003.

ŁOPUSIEWICZ, Ł. Isolation , characterisation and biological activity of melanin from *Exidia nigricans*. **World Scientific News**, v. 91, n. December 2017, p. 111–129, 2018.

MAGARELLI, M.; PASSAMONTI, P.; RENIERI, C. Purification , characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia Officinalis*) Purificación , caracterización y análisis de la melanina de sepia a partir de la tinta de sepia (*Sepia Officinalis*) Resumen. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 5, n. 2, p. 18–28, 2010.

MBONYIRYIVUZE, A. et al. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Sepia Melanin. **Physics and Materials Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 25–29, 2015a.

- MBONYIRYIVUZE, A. et al. Morphological and Chemical Composition Characterization of Commercial Sepia Melanin. **American Journal of Nanomaterials**, v. 3, n. 1, p. 22–27, 2015b.
- MIOT, L. D. B. et al. Physiopathology of melasma. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623–635, 2009.
- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203–223, 2003.
- OLIVEIRA, L. J. N.; ROCHA, I. M.; GUILLO, L. A. Ensaio radiométrico de tirosinase. **Rev. Bras. Farm.**, v. 85, n. 1, p. 5–6, 2004.
- PAVIA, D. L. et al. Espectroscopia no Infravermelho. In: **Introdução a Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 15–59.
- PITHAWALA, E. A.; JAIN, N. K. Synthesis and Screening of Melanin from Bacterial Strain EP83. **International Journal of scientific Research**, v. 2, n. 7, p. 35–36, 2013.
- PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms - Biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 429–443, 2006.
- PRADOS-ROSALES, R. et al. Structural Characterization of Melanin Pigments from Commercial Preparations of the Edible Mushroom *Auricularia auricula*. **J Agric Food Chem**, v. 63, n. 33, p. 7326–7332, 2015.
- SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 4, p. 1670–1677, 1987.
- SAJJAN, S. et al. Purification and physicochemical characterization of melanin pigment from *Klebsiella sp.* GSK. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 11, p. 1513–1520, 2010.
- SAJJAN, S. S. et al. Properties and functions of melanin pigment from *Klebsiella sp.* GSK. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 60–69, 2013.

SANTOS, C. N. S.; STEPHANOPOULOS, G. Melanin-based high-throughput screen for L-tyrosine production in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 1190–1197, 2008.

SHIVPRASAD, S.; PAGE, W. J. Catechol formation and melanization by Na⁺-dependent *Azotobacter chroococcum*: A protective mechanism for aeroadaptation? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 1811–1817, 1989.

SODDU, G. et al. Interference of Some Tryptophan Metabolites in the Formation of Melanin In Vitro. **Pigment Cell Research**, v. 17, n. 2, p. 135–141, 2004.

TARANGINI, K.; MISHRA, S. Production , Characterization and Analysis of Melanin from Isolated Marine *Pseudomonas sp* . using Vegetable waste. **Research Journal of Engineering Sciences**, v. 2, n. 5, p. 40–46, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **MICROBIOLOGIA**. 8. ed. Porto Alegre: Arpmmed, 2005.

TURICK, C. E. et al. Properties and Function of Pyomelanin. In: ELNASHAR, M. (Ed.). . **Biopolymers**. [s.l.] InTech, 2010. p. 449 – 472.

VASANTHABHARATHI, V.; LAKSHMINARAYANAN, R.; JAYALAKSHMI, S. Melanin production from marine Streptomyces. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 54, p. 11224–11234, 2011.

WHITTAKER, J. R. Changes in melanogenesis during the dedifferentiation of chick retinal pigment cells in cell culture. **Developmental biology**, v. 127, n. 8, p. 99–127, 1963.

YURLOVA, N. A.; HOOG, G. S. DE; FEDOROVA, L. G. The influence of ortho- and para-diphenoloxidase substrates on pigment formation in black yeast-like fungi. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 39–49, 2008.

ZAIDI, K. U. et al. Microbial Tyrosinases: Promising Enzymes for Pharmaceutical, Food Bioprocessing, and Environmental Industry. **Biochemistry Research International**, v. 2014, p. 1–16, 2014.

ZOU, Y.; ZHAO, Y.; HU, W. Chemical composition and radical scavenging activity of melanin from *Auricularia auricula* fruiting bodies. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 35, n. 2, p. 253–258, 2015.

ANEXO I

Meios de cultura e soluções

1. Meio batata (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

Batata inglesa	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL

Para o preparo desse meio, 200 g de batata inglesa serão pesadas, descascadas, lavadas e fervidas durante 30 minutos. Em seguida, a solução será filtrada em funil com algodão. As quantidades de ácido málico e açúcar cristal serão misturadas e dissolvidas em 50 mL de água destilada, e o pH será ajustado para 6,5 a 7,0 com KOH. Será adicionado ao filtrado essa solução e as soluções de micronutrientes e vitaminas. O volume será completado para 1.000 mL com água destilada e a solução será autoclavada.

2. Meio TY (*tryptone yeast*) (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

Triptona	5 g
Extrato de levedura	3 g
Cloreto de cálcio dihidratado	0,9 g
Água destilada	qsp 1 L

3. Meio YM (*yeast manitol*) ou meio 79 (VINCENT, 1970)

Manitol	10,0 g
Fosfato de potássio dibásico anidro	0,5 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2 g
Cloreto de sódio	0,1 g
Extrato de levedura	0,5 g
Água destilada	1 L

Ajustar o pH para 6,8.

4. Solução de micronutrientes (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

Molibdato de sódio	0,2 g L ⁻¹
Sulfato de manganês	0.235 g L ⁻¹
Ácido bórico	0,28 g L ⁻¹
Sulfato de cobre	0,008 g L ⁻¹
Sulfato de zinco	0,024 g L ⁻¹

Ajustar o pH para 6,8.

5. Solução de vitaminas (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

Biotina	0,001 g L ⁻¹
Piridoxina	0,002 g L ⁻¹

Ajustar o pH para 6,8. Manter a solução em geladeira.

As culturas foram preparadas em meios sólidos, adicionando-se 20 g.L⁻¹ de ágar ao meio líquido.

ANEXO II

Tabela 3 – Quantidade de melanina produzida por cada isolado durante o período de incubação em meio batata + L-triptofano (5 mmol L⁻¹) em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro

Tempo de incubação (h)	MT29		MT34		MT41		MT70		HM053	
	Melanina (µg mL ⁻¹)	DP	Melanina (µg mL ⁻¹)	DP	Melanina (µg mL ⁻¹)	DP	Melanina (µg mL ⁻¹)	DP	Melanina (µg mL ⁻¹)	DP
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	45,73	1,34	84,36	4,93	109,60	7,39	133,76	12,96	145,25	7,54
48	45,73	1,09	190,01	72,17	143,58	6,94	495,96	35,69	157,63	5,07
72	63,82	6,81	267,63	7,70	158,58	5,77	504,77	18,07	197,15	0,82
96	86,20	2,97	306,68	21,79	194,06	13,02	569,30	29,51	224,77	4,36
120	97,63	2,06	325,49	12,88	230,01	50,32	533,58	73,10	248,82	3,27
144	94,06	2,18	370,73	47,15	225,01	12,04	496,20	23,43	297,63	12,17
168	95,25	3,27	358,35	26,33	241,92	13,60	551,44	32,53	336,20	5,36
Média	66,05		237,91		162,85		410,63		200,93	

Tabela 4 – Quantidade de proteína produzida por cada isolado durante o período de incubação em meio batata + L-triptofano (5 mmol L⁻¹) em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro

Tempo de incubação (h)	MT29		MT34		MT41		MT70		HM053	
	Proteínas (µg mL ⁻¹)	DP	Proteínas (µg mL ⁻¹)	DP	Proteínas (µg mL ⁻¹)	DP	Proteínas (µg mL ⁻¹)	DP	Proteínas (µg mL ⁻¹)	DP
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	78,74	15,79	413,95	17,18	258,93	12,98	228,67	14,46	360,13	51,02
48	169,50	7,20	458,66	9,91	256,52	9,41	267,76	5,47	404,85	22,58
72	152,90	15,79	485,70	31,27	253,31	4,42	248,49	21,74	383,69	34,93
96	143,27	3,34	474,46	18,68	277,94	22,58	280,88	4,02	375,66	18,25
120	147,01	17,46	473,12	34,47	296,68	8,81	257,59	16,06	323,99	28,13
144	128,27	28,52	472,58	4,91	285,70	8,35	280,88	8,03	299,89	7,46
168	166,29	38,72	463,75	25,62	292,40	0,93	296,68	23,59	308,73	31,73
Média	123,25		405,28		240,18		232,62		307,12	

Tabela 5 – DO₆₀₀ de cada isolado durante o período de incubação em meio batata + L-triptofano (5 mmol L⁻¹) em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro

	MT29	MT34	MT41	MT70	HM053
Tempo de incubação (h)	DO ₆₀₀	DO ₆₀₀	DO ₆₀₀	DO ₆₀₀	DO ₆₀₀
0	0,001	0,006	0,004	0,001	0
24	0,916	1,218	1,358	0,814	1,109
48	0,996	1,127	1,298	0,879	1,049
72	0,992	1,049	1,195	1,018	0,967
96	1,023	1,135	1,201	1,019	0,938
120	0,955	1,048	1,153	1,019	0,792
144	0,844	0,832	1,073	1,036	0,724
168	0,846	0,821	1,102	1,123	0,725

Tabela 6 – Valor do pH de cada meio de cultura durante o período de incubação em meio batata + L-triptofano (5 mmol L⁻¹) em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro

	pH				
Tempo de incubação (h)	MT29	MT34	MT41	MT70	HM053
0	6	6	6	6	6
24	8	8	8	8	8
48	8	8	8	8	8
72	8,5	8	8	8	8,5
96	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
120	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
144	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
168	9,193	8,953	8,893	8,943	9,287

ANEXO III

Figura 19 – Espectrograma da região do infravermelho da melanina extraída de MT29 após 168 horas de incubação em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro

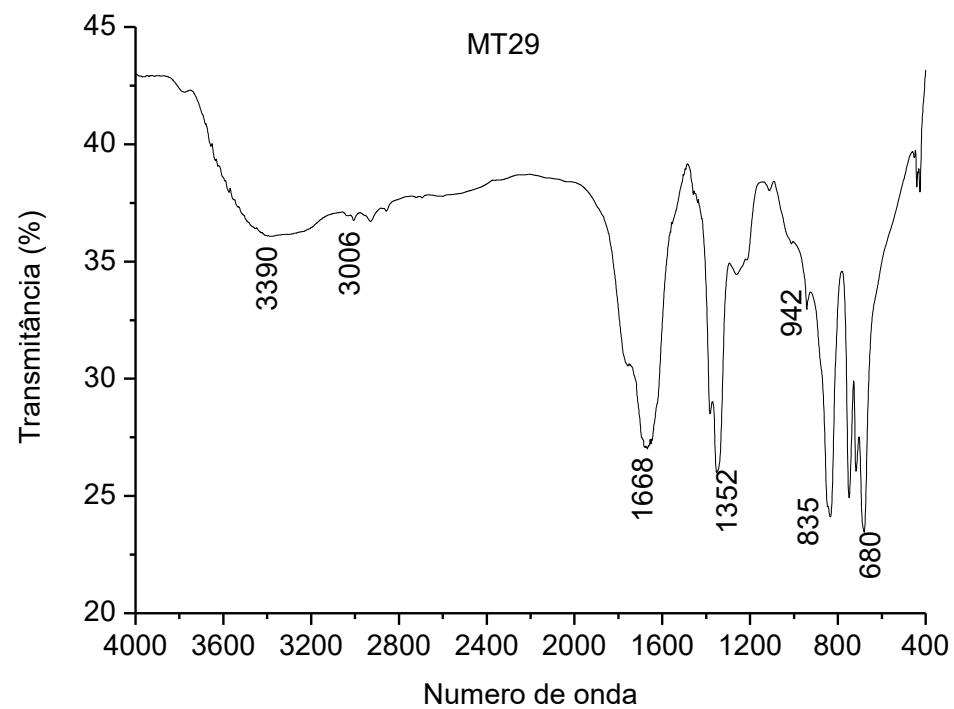


Figura 20 – Espectrograma da região do infravermelho da melanina extraída de MT34 após 168 horas de incubação em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro

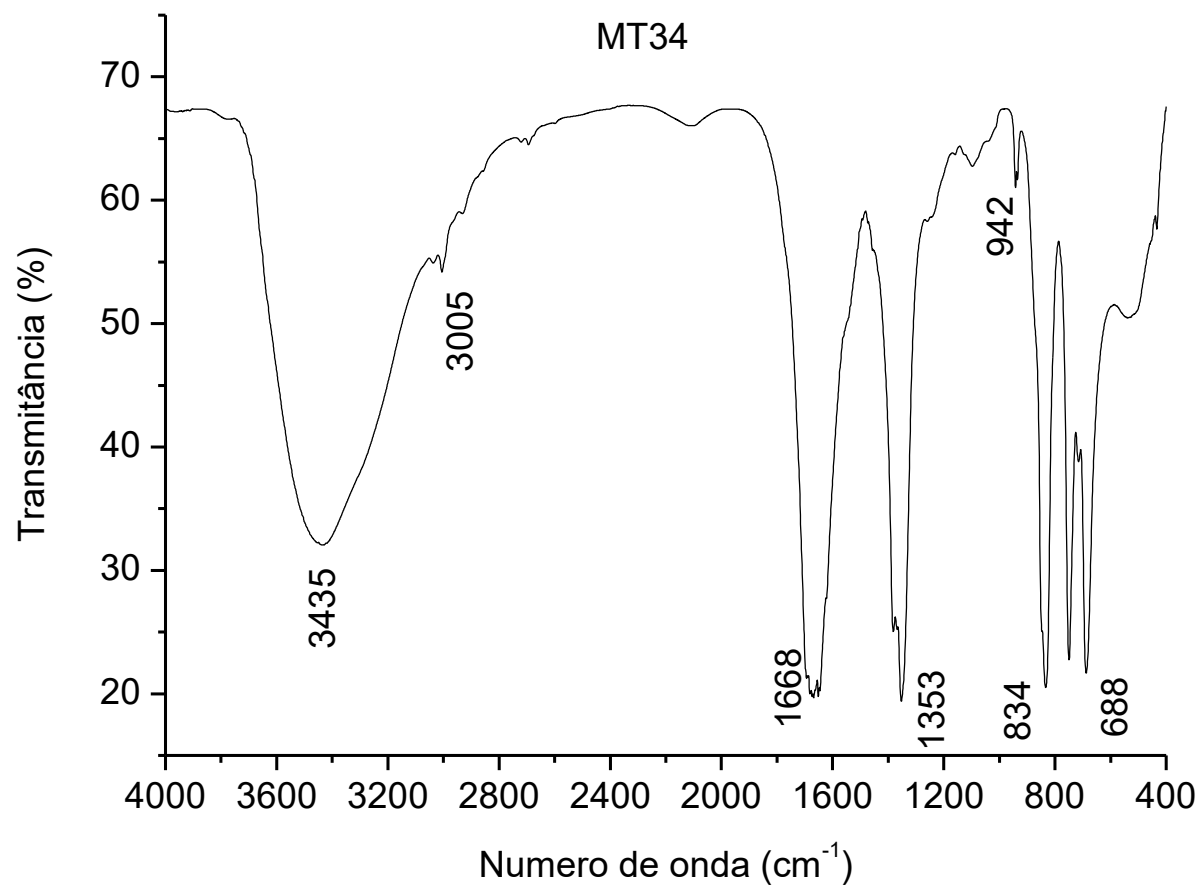


Figura 21 – Espectrograma da região do infravermelho da melanina extraída de MT41 após 168 horas de incubação em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro

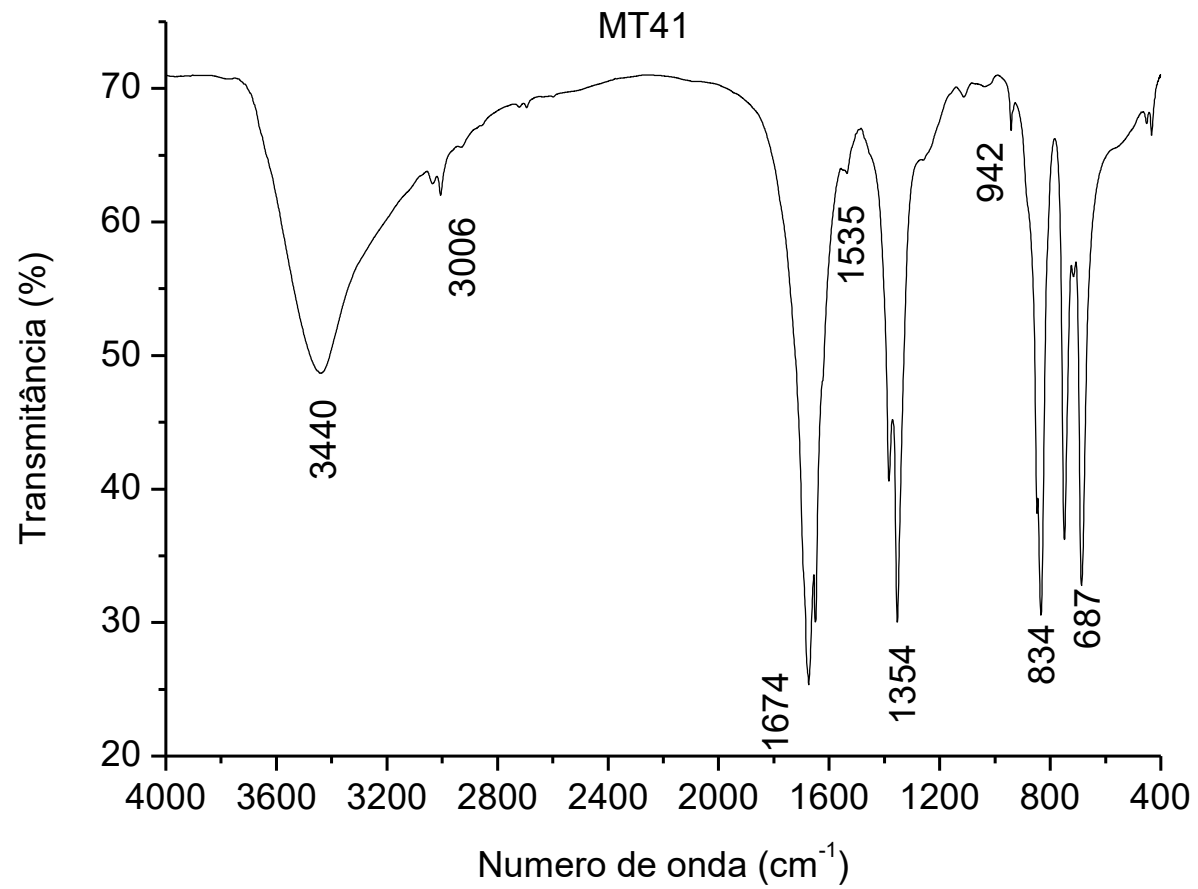


Figura 22 – Espectrograma da região do infravermelho da melanina extraída de MT70 após 168 horas de incubação em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro

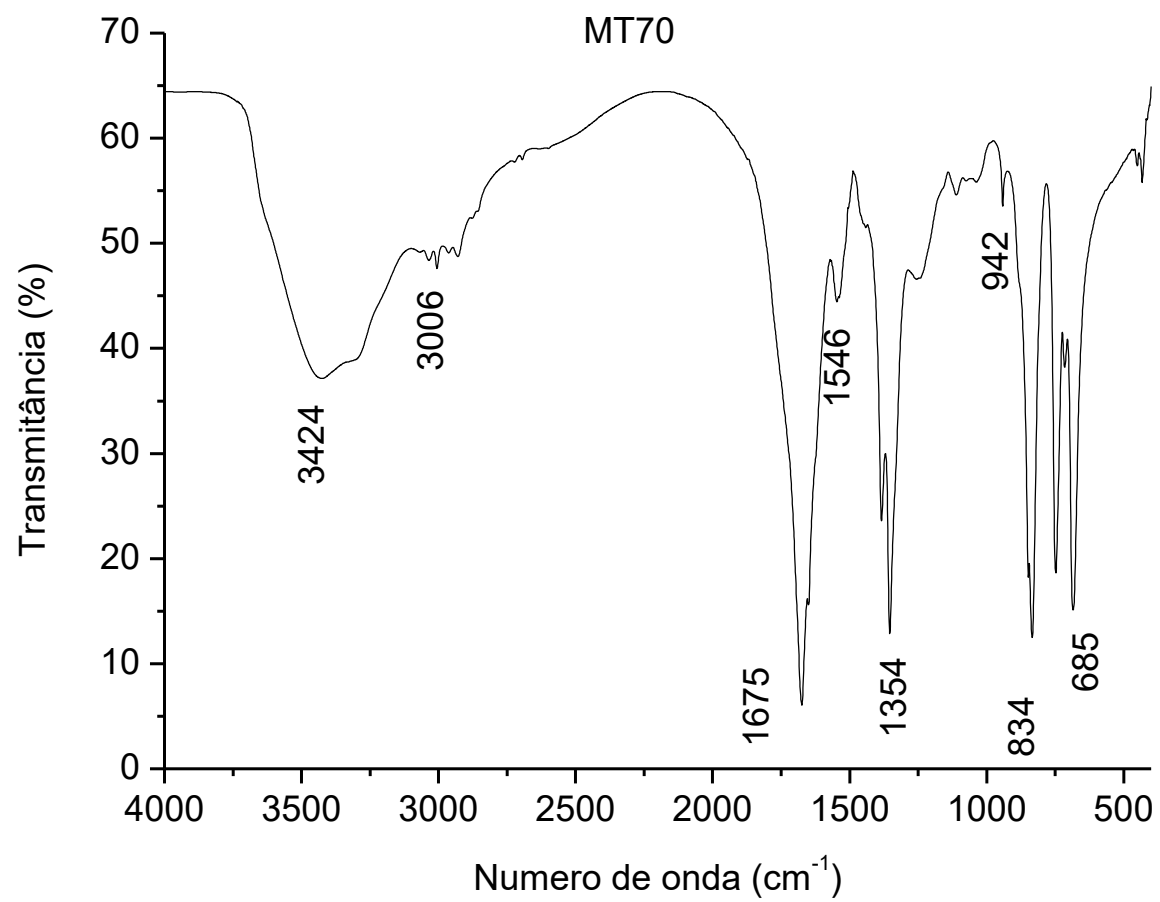


Figura 23 – Espectrograma da região do infravermelho da melanina comercial Sigma-Aldrich®

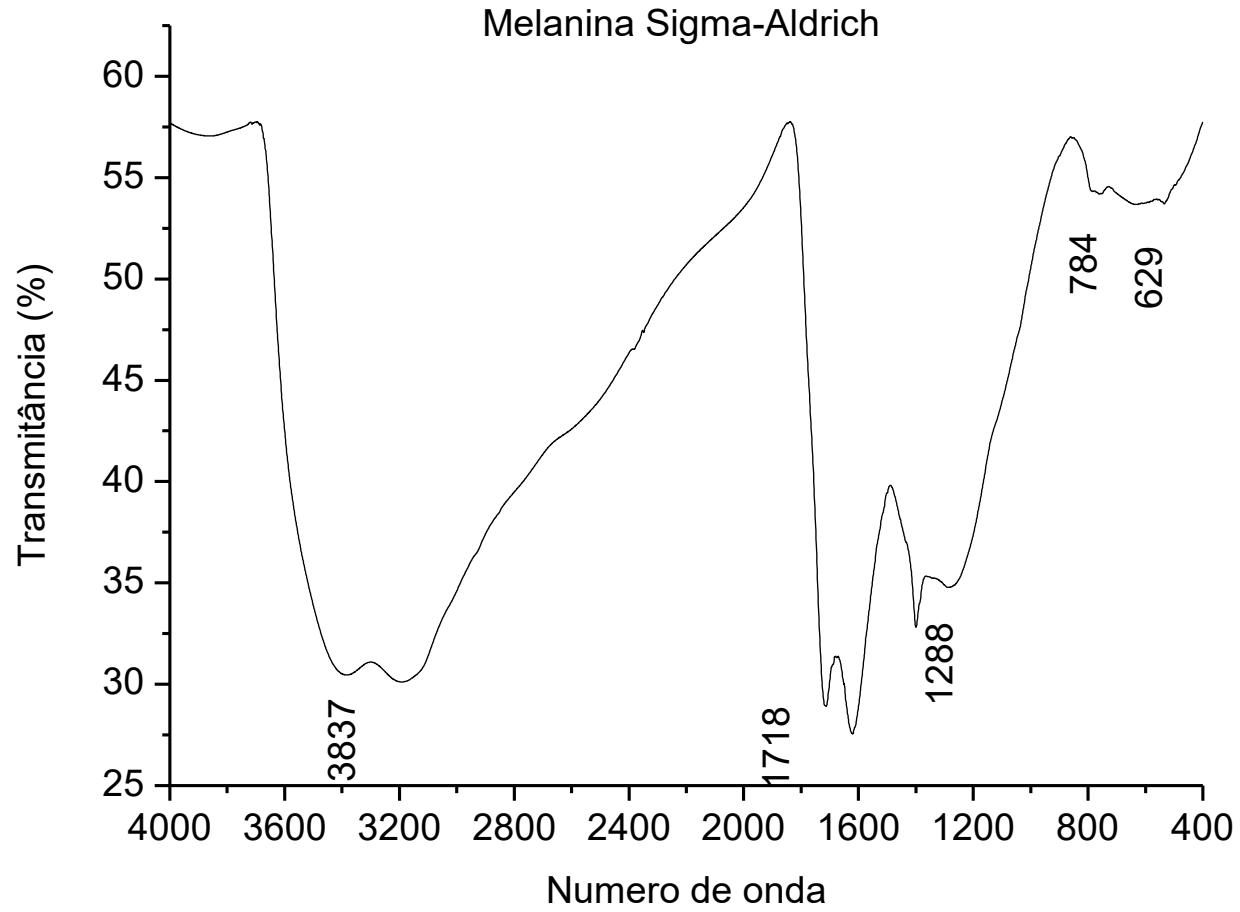


Figura 24 – Sobreposição dos espectrogramas da região do infravermelho das melaninas extraídas das estirpes MT29, MT34, MT41, MT70 e HM053 após 168 horas de incubação em agitador orbital a 140 rpm e 28 °C no escuro

