

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA MELANINA PRODUZIDA PELO FUNGO *Aspergillus nidulans*. Carla Andréa Leite, Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves Sandra Regina Pombeiro-Sponchiado, – Microbiologia – Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química - Instituto de Química - Campus de Araraquara.

Vários fungos, incluindo *Aspergillus nidulans*, produzem pigmentos relacionados ou idênticos à melanina, que estão localizados na parede celular ou presentes no meio de cultura como polímeros extracelulares. A melanina tem sido referida como uma “armadura do fungo” devido a sua capacidade de proteger estes organismos contra condições ambientais desfavoráveis, como radiação UV, altas temperaturas, enzimas hidrolíticas, metais pesados, agentes oxidantes (Butler & Day, 1998; Jacobson, 2000). A função deste pigmento em aumentar a sobrevivência dos fungos pode ser devido a sua capacidade de funcionar como um tampão redox, neutralizando os radicais livres gerados pelo estresse ambiental (Wang e Casadevall, 1994; Jacobson et al., 1995; Rosas et al., 2002). A importância biológica das espécies reativas de oxigênio (EROS) está centrada na formação de uma grande variedade de oxidantes secundários, os quais mostram capacidade destrutiva na célula (Halliwell, 1995; Babior, 2000). Deste modo, a descoberta de substâncias com atividade antioxidante é de fundamental importância para proteger as células contra os danos no DNA mediado pela EROS, os quais podem resultar em mutações levando, conseqüentemente, ao desenvolvimento de várias doenças.

Algumas evidências têm suportado o papel antioxidante das melaninas. Em estudos anteriores, nós demonstramos que a melanina extraída do fungo *A. nidulans* é capaz de neutralizar o ácido hipocloroso, considerado um dos oxidantes biológicos mais abundante e tóxico da célula, apresentando uma magnitude de proteção comparável a da melanina sintética (Gonçalves e Pombeiro-Sponchiado, 2005). Assim, a melanina produzida por fungos desperta interesse biotecnológico como matéria-prima farmacêutica, devido as suas atividades biológicas incluindo antioxidante, fotoprotetora e anti-inflamatória. Além disso, a sua produção em larga escala pode ser feita a um custo menor comparado ao da melanina sintética apresentando-se, portanto, como uma opção mais viável do ponto de vista econômico.

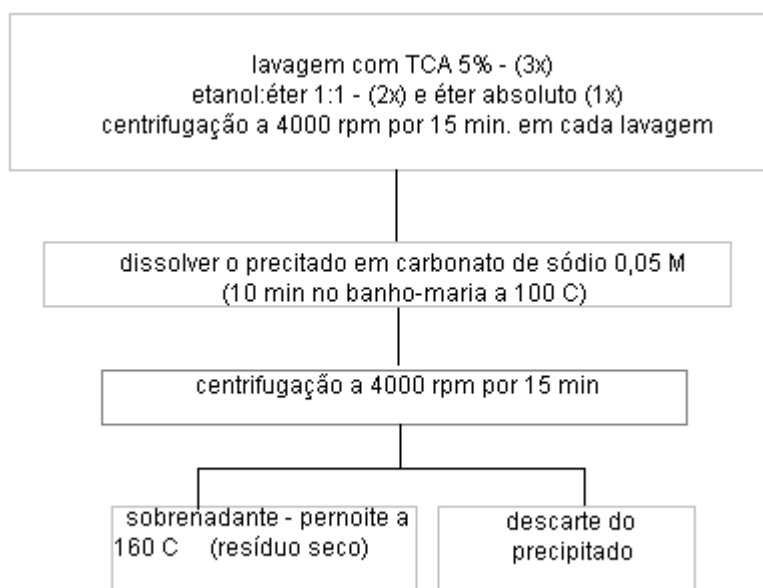
Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de técnicas para otimizar a extração do pigmento melanina produzido por uma linhagem altamente melanizada do fungo *Aspergillus nidulans*, visando uma possível aplicação prática deste pigmento.

O pigmento melanina presente no fungo *A. nidulans* foi obtido após cultivo de 10^7 conídios de uma linhagem altamente melanizada em 250 ml de meio mínimo suplementado com as fontes de carbono e nitrogênio e, também, os requerimentos nutricionais desta linhagem. Após 72 horas de crescimento a 37°C, sob agitação de 250 rpm, as culturas foram submetidas à filtração a vácuo para separação da massa micelial.

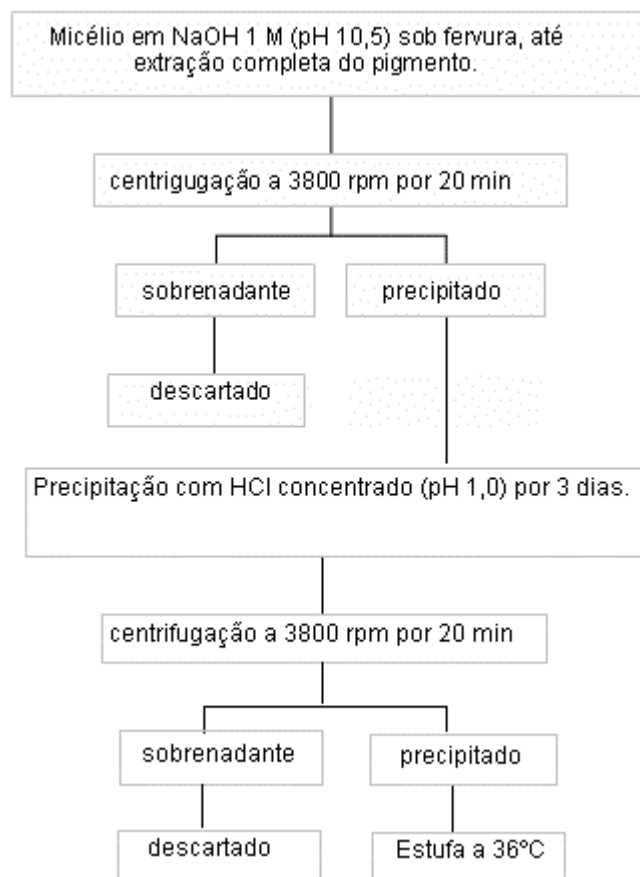
A extração da melanina presente no meio de cultura seguiu o método descrito por Paim *et al.* (1989), o qual consiste em precipitação com ácido clorídrico 7 M, até pH 1,0. Já que este pigmento apresenta-se insolúvel em soluções ácidas. Após 72 horas a melanina extracelular foi submetida à centrifugação de 3800 rpm por 20 minutos e lavada com água destilada estéril até atingir pH 5,3. O precipitado foi liofilizado e o sobrenadante descartado.

A extração do pigmento associado à parede celular foi realizada por dois diferentes métodos:

- 1) O primeiro procedimento utilizado foi descrito por Shivprasad & Page (1989), o qual consiste na maceração da massa micelial em nitrogênio líquido seguida de dissolução em carbonato de sódio e precipitação com ácido tricloroacético 5%.
- 2) O segundo procedimento utilizado foi descrito por Sava *et al.* (2001) com algumas modificações feitas em nosso laboratório. Neste procedimento a massa micelial foi colocada em hidróxido de sódio (1 M) e mantida sob fervura até a extração completa do pigmento, pois a melanina apresenta-se solúvel em soluções alcalinas. Em seguida, foi realizada a precipitação do pigmento com ácido clorídrico concentrado.



Fluxograma A



Fluxograma B

Figura 1 – Extração do pigmento associado à parede celular. O primeiro método descrito por Shivprasad & Page (1989) corresponde ao fluxograma A, enquanto que o segundo método descrito por Sava *et al.* (2001) com algumas alterações feitas em nosso laboratório é indicado pelo fluxograma B.

Os resultados obtidos mostraram que a quantidade de pigmento extraído do meio de cultura corresponde a 253 mg por litro de meio de cultura. Em relação à extração do pigmento presente no micélio, a quantidade obtida pelos métodos 1 e 2 foi, respectivamente, 68 mg/ gmassa micelial e 200 mg/ gmassa micelial. Analisando estes resultados verifica-se que o método 2 resultou em uma extração mais eficiente do pigmento presente no micélio, podendo ser utilizado para obtenção de uma maior quantidade de melanina do fungo *Aspergillus nidulans*, visando à purificação do pigmento para sua possível utilização como matéria-prima em formulações farmacêuticas.

Referências Bibliográficas

- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33-44, 2000.
- BUTLER, M. J. & DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Can. J. Microbiol.**, v. 44, p. 1115-1136, 1998.
- GONÇALVES, R. C. R.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. **Biol. Pharm. Bull.** v. 28, p. 1129-1131, 2005.
- HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochem. Pharmac.**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.

- JACOBSON, E. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 708-717, 2000.
- JACOBSON, E. S.; HOVE, E.; EMERY, H. S. Antioxidant function of melanin in black fungi. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 4, p. 4944-4945, 1995.
- PAIM, S.; LINHARES, L. F.; MANGRICH, A. S.; MARTIM, J. P. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. **Biol. Fertil. Soils**, v. 10, p. 72-76, 1989.
- ROSAS, À. L.; MACGILL, R. S.; NOSANCHUCK, J. D.; KOZEL, T. R., CASADEVALL, A. Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. **Clin. Diagn. Laborat. Immun.**, v. 9, n. 1, p. 44-148, 2002
- SAVA, V. M.; GALKIN, B. N.; HONG, M. Y.; YANG, P. C.; HUANG, G. S. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immuno-stimulating activity. **Food Res. Intern.**, v. 34, p. 337-343, 2001.
- SHIVPRASAD, S. & PAGE, W. J. Catechol formation and melanization by Nadeependent *Azotobacter chroococum*: a protective mechanism for aeroadaptation? **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 55, n. 7, p. 1811-1817, 1989.
- WANG, Y. & CASADEVALL, A. Susceptibility of melaninzed and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infec. Immun.** V. 62, p. 3004-3007, 1994.