

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

IGOR RIBEIRO SIMÕES

Otimização da produção de melanina por linhagens recombinantes de
Escherichia coli

São Carlos – SP

Julho de 2026

IGOR RIBEIRO SIMÕES

**Otimização da produção de melanina por linhagens recombinantes de
*Escherichia coli***

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado no Departamento de
Engenharia Química na Universidade
Federal de São Carlos**

**Orientador: Prof. Adilson José da
Silva**

São Carlos – SP

Julho de 2026

RESUMO

A melanina é um pigmento biológico responsável pela coloração da pele, cabelo e olhos em seres humanos e em muitos outros organismos, e tem aplicações biotecnológicas em medicina, farmacêutica, meio ambiente e nanotecnologia, destacando-se por suas propriedades antioxidantes, uso como corante natural e na biorremediação de metais pesados. Alguns microrganismos são capazes de produzir diferentes tipos de melanina, e linhagens recombinantes vem sendo desenvolvidas recentemente para otimizar a obtenção deste tipo de produto. Neste contexto, o presente trabalho propôs a clonagem da tirosinase de *Bacillus thuringiensis* (gene *melBt*) em diferentes linhagens de *Escherichia coli* para síntese de melanina a partir de tirosina. Além disso, foram avaliados alguns parâmetros de processo, como a fonte de carbono (sendo possível obter 2 g/L de produto a partir da suplementação com glicerol), a suplementação do meio com tirosina que garantiu um aumento em 3 vezes de concentração final comparado com a ausência dessa suplementação, e as condições de indução, bem como modificações genéticas adicionais, como a expressão de genes relacionados com a captação de oxigênio (*vhb50*) e da via de compostos aromáticos (*tkta*, *aroE* e *aroD*), garantindo um aumento considerável em comparação com a linhagens sem os alvos genéticos. A partir das linhagens construídas, foram realizados cultivos em triplicata em frascos aletados sob agitação com meio LB suplementado ou não. Os resultados obtidos indicaram uma forte influência da linhagem de *E. coli* escolhida para a produção, bem como da fonte de carbono e da presença de tirosina no meio. Além disso, todos os genes adicionais avaliados se mostraram favoráveis à formação de melanina, de forma que foi possível superar alguns dos trabalhos relatados na literatura para produção microbiana de melanina. Com isso, ao final do trabalho, foi possível obter linhagens recombinantes promissoras para produção de melanina e informações iniciais para otimização do processo de obtenção deste composto de interesse biotecnológico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivos Específicos	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Design de Primers e Análise In Silico	12
3.2 Extração de DNA Genômico e Plasmidial	15
3.3 Amplificação por PCR, digestão enzimática e purificação	15
3.4 Procedimentos para construção das linhagens geneticamente modificadas	16
3.5 Confirmação da ligação e transformação	17
3.6 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	17
3.7 Análise do perfil de crescimento celular e produção de melanina	18
3.8 Curva de calibração para melanina	19
3.9 Extração da melanina	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Confirmação da ligação e transformação	20
4.2 Curva de calibração da melanina	21
4.3 Análise do crescimento celular e da expressão de tirosinase para a produção de melanina por linhagens recombinantes de E. coli	22
4.4 Produção de melanina a partir de glicerol ou glicose	26
4.5 Avaliação do efeito da concentração de IPTG	28
4.6 Avaliação do efeito do momento da indução	30
4.7 Efeito da suplementação de tirosina	32
4.8 Avaliação de alvos genéticos adicionais para maior produção de melanina	34
4.9 Extração da melanina	36
5. CONCLUSÃO	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aplicações da melanina.

Figura 2. Via biossintética da eumelanina e alinhamento tirosinases.

Figura 3. Esquema do plasmídeo.

Figura 4. Ilustração do método utilizado para a clonagem nos vetores e transformação nas linhagens.

Figura 5. Esquema representativo do método usado para a extração de melanina.

Figura 6. Mapa do plasmídeo pETM7 com o inserto *melBt*. Resultado em gel de agarose.

Figura 7. Ensaio de digestão e resultado em gel de agarose.

Figura 8. Gráfico ilustrando a curva de calibração da melanina.

Figura 9. Curvas de crescimento e concentração de melanina para as diferentes linhagens.

Figura 10. Comparação ilustrando cultivo das linhagens.

Figura 11. Gel de agarose com a amplificação do gene *melBt*: DH5 α , W e K12 MG1655.

Figura 12. Curvas de crescimento e concentração de melanina no teste da fonte de carbono.

Figura 13. Curvas de crescimento e concentração de melanina no teste concentração de IPTG.

Figura 14. Curvas de crescimento e concentração de melanina no teste momento de indução.

Figura 15. Curvas de crescimento e concentração de melanina na ausência de tirosina.

Figura 16. Via do chiquimato.

Figura 17. Curvas de crescimento e concentração de melanina com alvos genéticos adicionais.

Figura 18. Etapas de extração da melanina

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Produção de melanina por diferentes microrganismos.

Quadro 2. Genes encontrados através da pesquisa realizada no GenBank.

Quadro 3. Sequências e informações dos *primers* para *melBt*.

Quadro 4. Tabela ANOVA.

1. INTRODUÇÃO

Melaninas são um grupo de pigmentos naturais encontrados em muitos organismos, incluindo fungos, bactérias, plantas e animais. Elas são produzidas pela oxidação de moléculas fenólicas e indólicas, resultando em vários tipos, como eumelanina, feomelanina, piomelanina e alomelanina, cada um com diferentes precursores monoméricos^{1,2}.

As melaninas têm propriedades únicas, como absorver uma ampla faixa de radiações, exibir atividade antioxidante e ter comportamento semelhante a semicondutores. Devido a essas características e à sua biocompatibilidade, as melaninas têm aplicações potenciais em várias áreas. Na área farmacêutica, por exemplo, a melanina pode ser utilizada em protetores solares para aumentar o fator de proteção solar³, já que essa molécula apresenta em sua constituição grupos fenólicos e quinônicos que são bons dissipadores de radiação UV. Outro exemplo envolve o desenvolvimento de dispositivos implantáveis, em que incorporou-se nanopartículas de melanina em matrizes de amido para uma liberação fototérmica controlada do medicamento⁴⁻⁶.

Na indústria de cosméticos a melanina também demonstra resultados promissores, como o uso de hidrogéis contendo nanopartículas de melanina para garantir ação antimicrobiana, antioxidante e fotoprotetora para aplicação tópica⁷.

Na remediação ambiental, a melanina também encontra aplicações, uma vez que bactérias melanogênicas têm afinidade e alta absorção de metais, como ferro, cobre, chumbo, mercúrio, cádmio e níquel^{1,5}. Em trabalhos recentes, foram realizados testes de biorremediação de locais poluídos utilizando microrganismos produtores de melanina, os quais possuem a capacidade de absorção de moléculas orgânicas e devido a sua produção de melanina, permite uma maior resistência ao estresse oxidativo^{6,8}. Outras aplicações incluem a capacidade de sobrevivência de microrganismos no espaço, devido à melanina, e degradação de microplásticos especiais⁹. Além disso, o fungo *Cladosporium sphaerospermum*, que produz melanina para resistência contra radiação UV e estresse oxidativo, demonstrou a capacidade de usar a melanina para converter radiação em energia química, e também realizar a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos⁹.

Ainda, a estrutura complexa dessa molécula permite condutividade elétrica e iônica, e capacidade de quelação de íons metálicos para aplicação em semicondutores orgânicos e bioeletrônicos¹⁰. Essas aplicações podem ser visualizadas na Figura 1.

Além disso, estudos vêm sendo realizados em função dos benefícios que a melanina

poderia trazer ao ser consumida, por exemplo, devido à suas capacidades antioxidantes que são comparáveis com a vitamina C. Essa capacidade também está relacionada com uma melhora na imunidade, ajudando a reduzir a resposta inflamatória e auxílio no estresse hepático e intestinal¹¹. A melanina presente no fungo *Sporisorium reilianum* pode inibir significativamente a atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase¹², promover a captação de glicose pelas células hepáticas para a síntese de glicogênio hepático e retardar a absorção de glicose na corrente sanguínea pelo intestino delgado¹³. Portanto, a melanina mostra um potencial muito grande como um corante alimentício funcional.

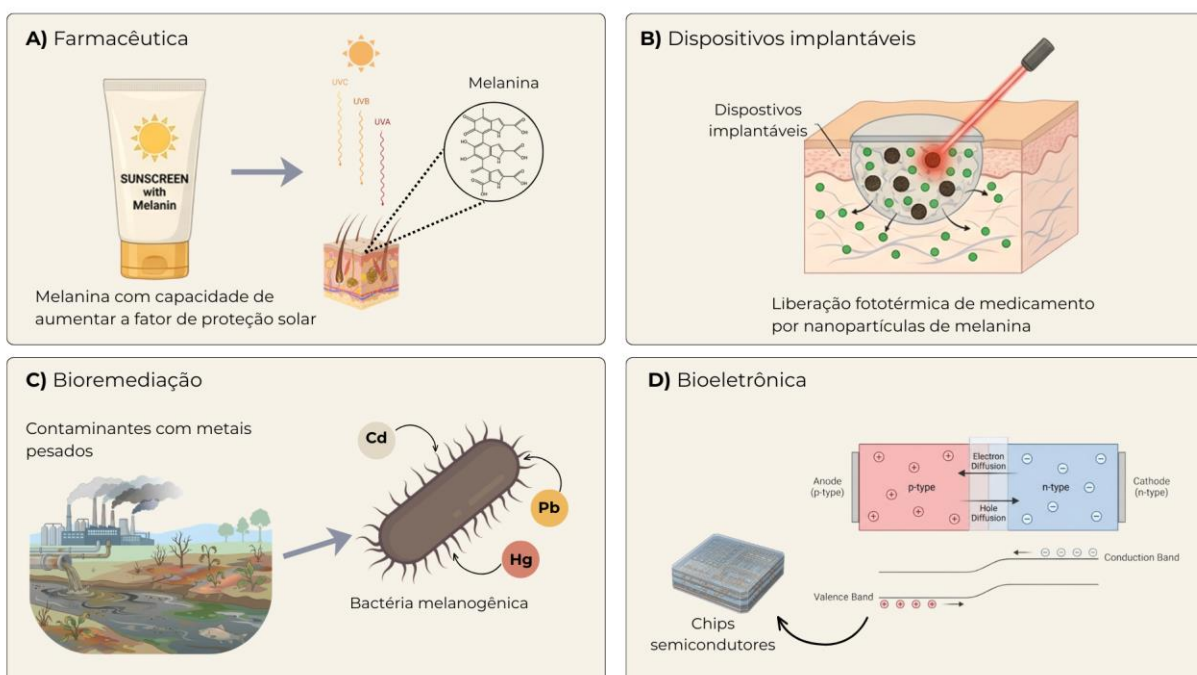


Figura 1. Representação de algumas aplicações da melanina. (A) Aplicação da melanina com uma forma de aumento do fator de proteção solar. (B) Dispositivos implantáveis: liberação fototérmica de medicamento através da melanina. (C) Biorremediação: bactérias melanogênicas podem absorver metais pesados. (D) Representação resumida do funcionamento de um semicondutor, onde a melanina poderia ser aplicada. Fonte: Autoria própria, alguns modelos gerados por IA - FigureLabs, 2026.

A melanina é tradicionalmente extraída de fontes naturais como sacos de tinta de lulas (*Sepia officinalis*) ou sintetizada quimicamente¹⁷⁻¹⁹. No entanto, esses métodos convencionais enfrentam desvantagens significativas, como altos custos de produção, escalabilidade limitada e riscos ambientais potenciais devido a resíduos químicos. Além disso, no Brasil, a melanina usada para cosméticos por exemplo é importada, devido a baixa produção no cenário nacional. Como resultado, houve um interesse crescente na bioprodução de melanina por microrganismos

como uma alternativa mais sustentável e econômica ¹.

Fungos e bactérias oferecem várias vantagens como produtores de melanina. Esses microrganismos podem ser cultivados rapidamente usando meios de crescimento simples e processos de fermentação que podem ser facilmente ampliados para produção em massa. Muitas espécies, incluindo algumas dos gêneros *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bacillus* e *Streptomyces*, são produtoras naturais de melanina, e essa produção pode ser otimizada por meio de melhoramento de linhagens e engenharia de processos ^{1,2}. Por exemplo, o desenvolvimento de linhagens microbianas recombinantes projetadas para superexpressar enzimas melanogênicas-chave permitiu rendimentos ainda mais altos de melanina a partir de matérias-primas renováveis ^{1,5}.

Em comparação com as melaninas derivadas de animais ou sintéticas, as melaninas microbianas são mais ecologicamente corretas, podem ser adaptadas a aplicações específicas e potencialmente mais seguras para uso humano ^{20,21}. Com a pesquisa e a inovação contínuas, as melaninas produzidas biologicamente estão prestes a se tornar a fonte preferida para uma ampla gama de indústrias, desde cosméticos e cuidados pessoais até aplicações biomédicas e agrícolas ^{20,21}.

Vários estudos têm empregado microrganismos geneticamente modificados para aumentar a produção de melanina, destacando o potencial da biotecnologia nesta área. Um exemplo-chave é uma patente dos EUA que descreve o uso de linhagens recombinantes de *E. coli* projetadas para expressar a enzima tirosinase, um catalisador crucial na síntese de melanina ²². Essa abordagem permitiu a geração de uma linhagem de *E. coli* capaz de produzir melanina em níveis comparáveis aos de microrganismos naturalmente produtores de melanina. Outros autores também relataram a produção de melanina em *E. coli* a partir da expressão de tirosinases e abordagens de Engenharia Metabólica para favorecer a formação de precursores para biossíntese de melanina, atingindo concentrações de produto de até 6 g/L ^{23,24}. Além da *E. coli*, outros microrganismos recombinantes já foram desenvolvidos para produção da melanina como, por exemplo, as bactérias *Vibrio natriegens*²⁵ e *Streptomyces khatirae*²⁶, entre outros. O Quadro 1 reúne alguns dados de microrganismos encontrados na literatura que foram testados como produtores de melanina.

Do ponto de vista do metabolismo celular, a produção de melaninas envolve uma série de reações enzimáticas a partir de precursores como aminoácidos aromáticos, principalmente a tirosina. O processo se inicia com a oxidação da tirosina pela enzima tirosinase, formando o intermediário dopaquinona. Em seguida, ocorrem reações de ciclização e polimerização,

levando à formação de diferentes tipos de melaninas, entre as quais a eumelanina ^{2, 14}, conforme ilustrado na Figura 2A. Esse metabolismo melanogênico é regulado por fatores ambientais, como disponibilidade de oxigênio, pH e presença de íons metálicos, que podem modular a atividade das enzimas envolvidas ^{2, 14, 15}.

Além disso, a partir de um alinhamento, Figura 2B, realizado de sequências de tirosinases foram observados vários resíduos conservados de histidina (His), que desempenham um papel crítico na coordenação dos íons de cobre (Cu^{2+}) no sítio ativo da tirosinase. Esses íons são essenciais para a atividade catalítica da enzima, participando da oxidação da tirosina para a formação de melanina e outros produtos relacionados ¹⁶.

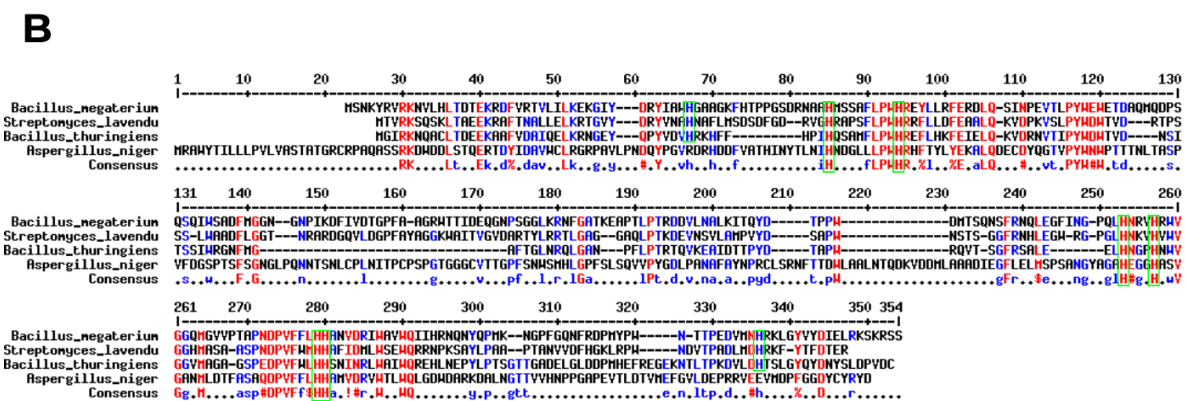
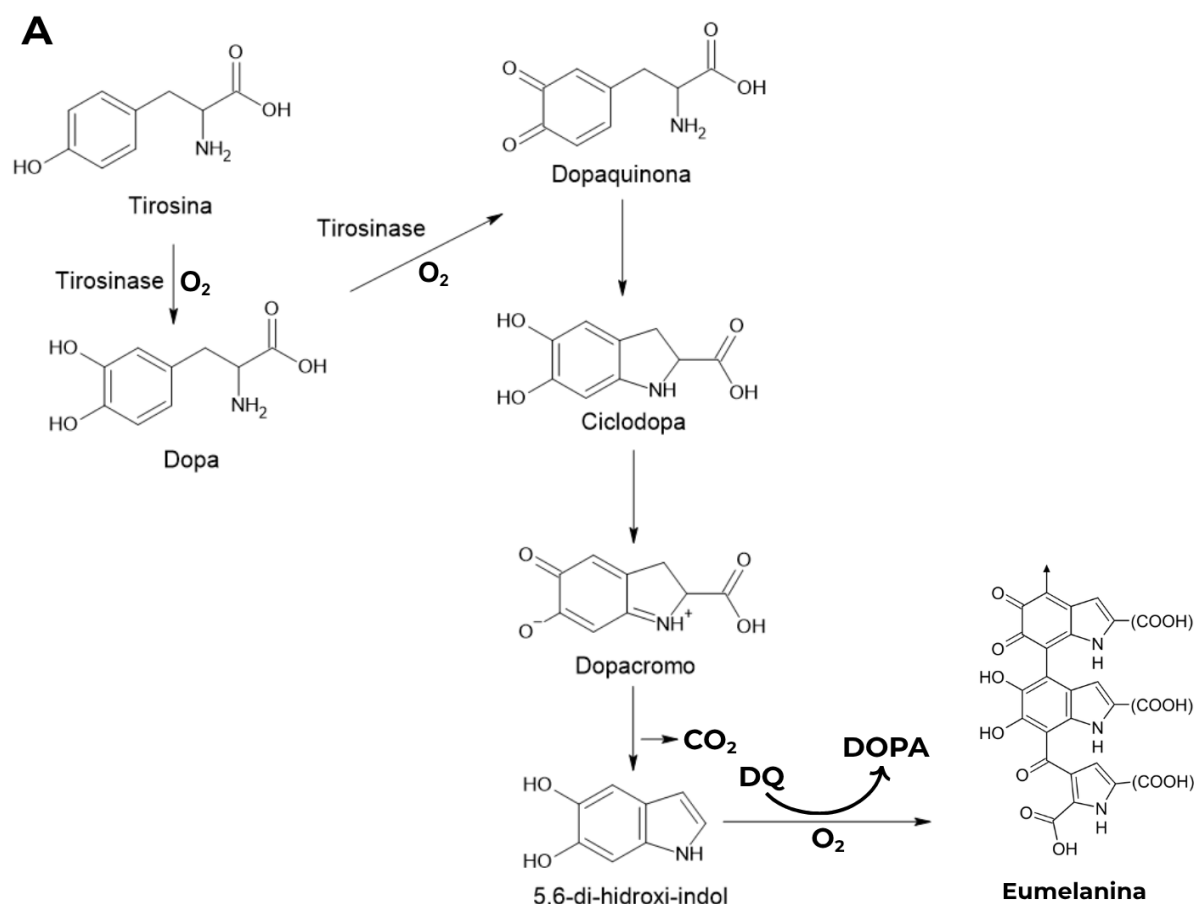


Figura 2. (A) Via biossintética da eumelanina a partir da tirosina e ação da tirosinase. Fonte: Autoria própria. (B) Alinhamento realizado entre algumas tirosinases em que os resíduos de histidinas estão destacados em verde.

Organismo Hospedeiro (Tipo)	Gene	Substrato	Tipo de melanina	Produção (g/L)	Tempo de Cultivo	Ref.
<i>Armillaria cepistipes</i> (Fungo)	-	Tirosina	Eumelanina	27.98 g/L	161 dias	Ribera et al. (2019) ²⁷
<i>Streptomyces kathirae</i> (Bactéria)	Selvagem	Amilodextrina	Eumelanina	13.7 g/L	128 h	Guo et al. (2014) ²
<i>Escherichia coli</i> W3110 (Bactéria recombinante) - Batelada	melA	Tirosina	Eumelanina	6,0 g/L	80 h	Lagunas-Muñoz et al, (2006) ²³
<i>Amorphotheca resinae</i> (Bactéria)	Selvagem	Glicose	Eumelanina	4.5 g/L	14 dias	Oh et al. wang(2020) ²⁸
<i>Streptomyces sp. ZL-24</i> (Bactéria)	Selvagem	Peptona de soja	Eumelanina	4.24 g/L	5 dias	Wang et al. (2019) ²⁹
<i>Escherichia coli</i> BL21 (Bactéria Recombinante)	melC, cyp102G4	Tirosina	CYP-Melanina	3.4 g/L	48 h	Park et al. (2020) ³⁰
<i>Vibrio natriegens</i>	tyr1	Tirosina	Eumelanina	0,45 g/L	2 h	Wang Z et al. (2020) ²⁵
<i>Escherichia coli</i> 4-hppd (Bactéria Recombinante)	4-hppd	Tirosina	Piomelanina	0.315 g/L	24 h	Seo, Choi (2020) ³¹
<i>Escherichia coli</i> fcs/ech (Bactéria Recombinante)	fcs/ech	Ácido cafeico	Alomelanina	0.17 g/L	12 h	Ahn et al. (2019) ³²
<i>Ralstonia picketti</i> (Bactéria)	Selvagem	Tirosina	Piomelanina	0.09 g/L	62 h	Seo, Choi (2020) ³¹
<i>Escherichia coli</i> W3110M (Bactéria Recombinante) - Biorreator	VH33MGT R	Glicose	Eumelanina	3.22 g/L	120 h	Chávez-Béjar et al., (2013) ²⁴
<i>Escherichia coli</i> W3110M (Bactéria Recombinante)	VH33MGT R	Glicose	Eumelanina	0.151 g/L	120 h	Chávez-Béjar et al., (2013) ²⁴

Quadro 1. Produção de melanina por diferentes microrganismos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto é realizar a expressão de uma tirosinase para a produção de melanina heteróloga em diferentes linhagens de *E. coli*, além de otimizar o processo através de ajustes de parâmetros, substrato e engenharia genética.

2.1 Objetivos Específicos

- Clonar o gene *melBt* de *Bacillus thuringiensis* no vetor, que codifica para a enzima tirosinase, cuja atividade é necessária para conversão da L-tirosina em melanina.
- Transformar diferentes linhagens de *E. coli* com o plasmídeo recombinante para avaliar se o genótipo da cepa pode exercer alguma influência na produção do composto de interesse.
- Avaliar a produção de melanina em cultivos em frascos agitados comparando o desempenho das cepas com relação aos perfis de crescimento celular e concentração máxima de produto.
- Avaliar condições específicas para a otimização da expressão, como a variação da fonte de carbono, sendo glicose ou glicerol, concentração de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo), momento de indução e ausência de suplementação de tirosina.
- Avaliar o efeito da expressão conjunta de genes relacionados com a produção de tirosina (precursor da melanina) e captação de oxigênio na produção de melanina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Design de *Primers* e Análise *In Silico*

A pesquisa de sequências de DNA relacionadas à expressão da tirosinase foi realizada no GenBank, banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A busca foi conduzida utilizando palavras-chave associadas à enzima tirosinase e sua expressão em diferentes organismos.

Foram selecionadas sequências de diferentes organismos previamente descritos na literatura como produtores de tirosinase e disponíveis em nosso laboratório, incluindo *Bacillus*

megaterium, *Bacillus thuringiensis*, *Aspergillus niger*, *Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendulae* e *Hypocrea jecorina*, listadas no quadro 2. Posteriormente, as sequências foram submetidas a um alinhamento múltiplo, com o objetivo de verificar a conservação das regiões gênicas.

Microorganismo	Número de acesso
<i>Aspergillus niger</i>	XP_025459129.1
<i>Bacillus megaterium</i>	WP_053487522.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792	WP_001222641.1
<i>Streptomyces lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i> ATCC 8664	WP_030230139.1
<i>Streptomyces lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i> ATCC 8664	WP_030231593.1
<i>Streptomyces lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i> ATCC 8664	WP_030229759.1
<i>Streptomyces lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i> ATCC 8664	WP_030229776.1
<i>Hypocrea jecorina</i>	CAL90884.1
<i>Pichia pastoris</i>	não encontrado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	não encontrado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1	não encontrado
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	não encontrado
<i>Staphylococcus aureus</i>	não encontrado
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	não encontrado
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	não encontrado
<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951	não encontrado
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC 33913	não encontrado
<i>Zymomonas mobilis</i>	não encontrado

Quadro 2. Genes encontrados através da pesquisa realizada no GenBank para os microrganismos do LaFaC. Fonte: Autoria própria.

Após a obtenção das sequências de tirosinase, a *melBt* extraída do *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 foi escolhida para a clonagem, e então foram desenhados *primers* específicos para o gene selecionado utilizando o software SnapGene. A análise da formação de estruturas secundárias, como *hairpins* e *primer-dimers*, foi realizada utilizando ferramentas online, como IDT *OligoAnalyzer*.

Gene	Primer	Sequência (5' → 3')	Sítios de restrição	Conteúdo	T _m
<i>melBt</i>	Forward	AGTCAC <u>CATATG</u> AGAATTAGAAAAAA TCAAGCTAATC	KpnI	28% GC	53°C
	Reverse	TCACT <u>GGTACC</u> TTACATCTTCTCTAA ATCCTCTCG	NdeI	43% GC	53°C

>*Bacillus_thuringiensis*

MGIRKNQACLTDEEKAAAFVDIAIQELKRNGEYQPYVDVHRKHFFHPIHQSAMFLPWHREFLHKFEIELQKV
DRNVTIPYWDWTVDNSITSSIWRGNFMGAFTGLNRQLGANPFLPTRTQVKEAIDTTPYDTAPWRQVTSGF
RSALEELHNGPHNWVGGVMAGAGSPEDPVFWLHHSNINRLWAIWQREHLNEPYLPTSGTTGADELGLDDP

Quadro 3. Sequências e informações dos *primers* desenhados para amplificação da sequência codificadora da tirosinase de *B. thuringiensis*. Em sublinhado estão indicados os sítios de restrição utilizados para clonagem e, abaixo, a sequência de aminoácidos da tirosinase de *Bacillus thuringiensis*. Fonte: Autoria própria.

A funcionalidade de emulação de PCR do software SnapGene foi utilizada para verificar a inserção correta do fragmento de interesse, incluindo os sítios de restrição necessários para a clonagem. A montagem do mapa do plasmídeo recombinante foi realizada utilizando o software SnapGene e o mapa do vetor pETM7^{27, 28}, conforme ilustrado na figura 3.

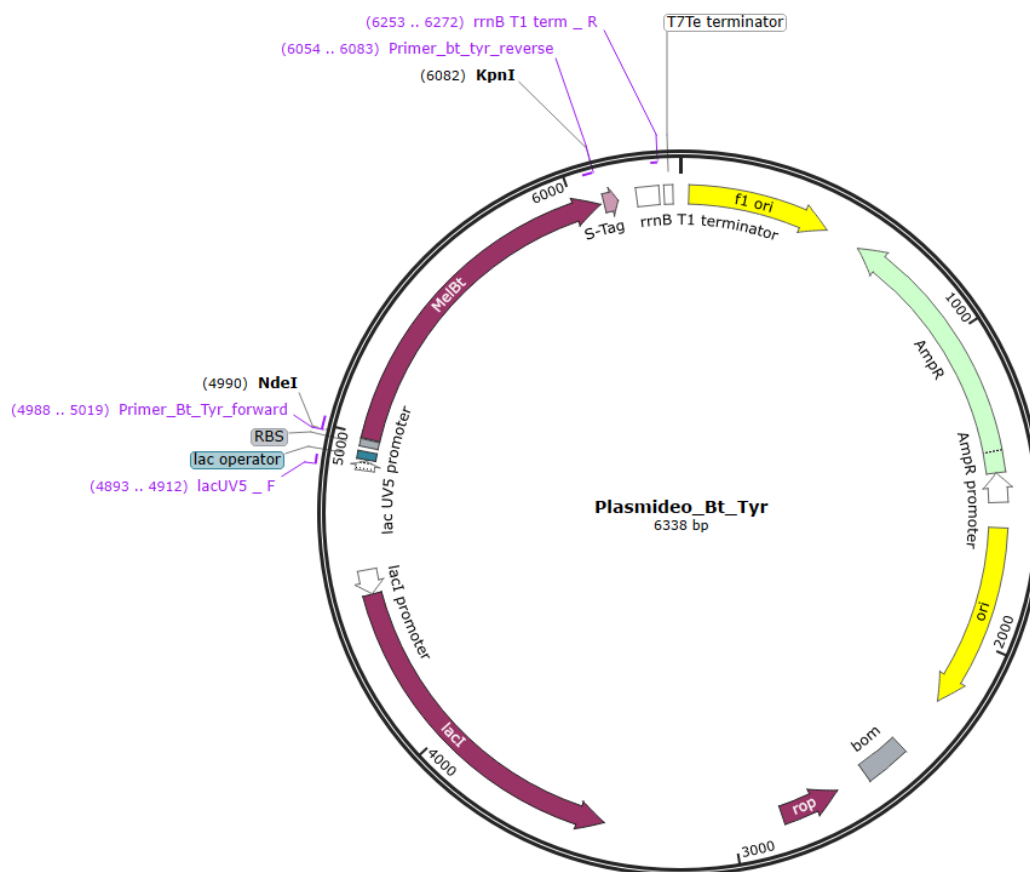


Figura 3. Esquema do plasmídeo pETM7^{27, 28} com o inserto da tirosinase (*Bacillus thuringiensis*) em vinho com o nome *melBt*, realizado no “Snapgene”. Fonte: Autoria própria.

3.2 Extração de DNA Genômico e Plasmidial

A extração do DNA genômico de *Bacillus thuringiensis* foi realizada utilizando o *PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen)*. Para a obtenção do plasmídeo pETM7^{27, 28}, a linhagem de *E. coli* DH5α contendo o plasmídeo (estoque do laboratório) foi cultivada *overnight* a 37°C e 200 rpm em meio LB, e a extração do plasmídeo foi realizada com o *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)*.

3.3 Amplificação por PCR, digestão enzimática e purificação

Para a amplificação da sequência selecionado foi realizada a PCR com a polimerase *GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega)*, sendo cada reação preparada para o volume final de

50 µL, com 12.5 µL do *Buffer* com a polimerase, 0,4 mM (2 µL de primer), 77 ng/µL (2 µL molde) de DNA e 33,5 µL de *Nuclease-Free Water*.

Após a amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, seguida da purificação utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). As reações de digestão com volume final de 30 µL foram preparadas para os insertos e para o plasmídeo a 37°C por 4 horas, utilizando 1 µL das enzimas *FastDigest KpnI* (Thermo Scientific) e *FastDigest NdeI* (Thermo Scientific), 3 µL de Green Buffer e 1000 ng do amplicon. Para o plasmídeo, foi realizado um tratamento adicional com 5 µL de fosfatase alcalina *Anza™* (Invitrogen) a 37°C por 1 hora. Após a digestão, uma nova purificação foi realizada utilizando o mesmo kit de purificação.

3.4 Procedimentos para construção das linhagens geneticamente modificadas

O gene *melBt* (*Bacillus thuringiensis*) foi amplificado a partir do DNA genômico extraído das células (estoque do laboratório) e para a clonagem do gene *melBt* foi utilizado o plasmídeo pETM7^{27, 28}.

O plasmídeo e o inserto digeridos foram utilizados para a montagem da reação de ligação, foi realizada com 5U/µl da enzima ligase (Thermo Scientific™) em temperatura ambiente por 3 horas, seguida do choque térmico para a transformação das células de *E. coli* DH5α. Em seguida, realizou-se o plaqueamento em meio LB ágar com ampicilina, a partir do qual obteve-se clones positivos da transformação do plasmídeo pETM7_melBt, como ilustrado na figura 4.

Além disso, escolheu-se alvos genéticos com intuito de aumentar a produção de melanina. Para isso, utilizou-se dos genes *tktA*, *aroE* e *aroD*, os quais codificam para enzimas atuantes na síntese de compostos aromáticos para um potencial aumento na disponibilidade de tirosina e outro gene testado foi o *vhb50*, o qual se mostra como um potencial facilitador da captação de oxigênio. Assim, foi realizada a transformação dos plasmídeos pRtA (plasmídeo pRSM4⁴⁵ + gene *tktA*), pRaD (plasmídeo pRSM4 + gene *aroD*), pRaE (plasmídeo pRSM4 + gene *aroE*), pRtAvhb50aEaD (plasmídeo pRSM4 + genes *tktA*, *aroD*, *aroE*, *vhb50*) e pRtAvhb50 (plasmídeo pRSM4 + gene *tktA* e *vhb50*) nas células DH5α com plasmídeo pETM7^{33,34} com gene *melBt*.

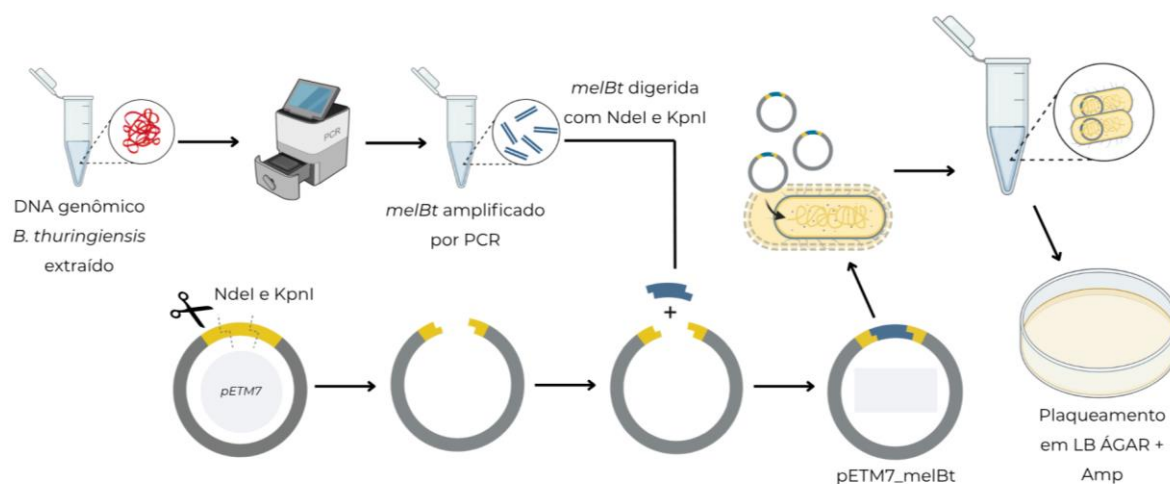


Figura 4. Ilustração do método utilizado para a clonagem no vetor pETM7^{27, 28} e transformação das linhagens usadas para expressão de tirosinase para a produção posterior de melanina. Fonte: Autoria própria.

3.5 Confirmação da ligação e transformação

Após a transformação do plasmídeo pETM7 com o gene para tirosinase (*melBt*), as colônias positivas tiveram seu plasmídeo extraído por meio do *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen). Então, realizou-se uma PCR utilizando 1 µL do plasmídeo diluído como molde, 12,5 µL da polimerase *GoTaq® G2 DNA Polymerase* (Promega), 1 µL do par de primers (utilizado para a amplificação do gene *melBt*), 10,5 µL de *Nuclease Free Water*. Além disso, um ensaio de restrição foi realizado com o plasmídeo, utilizando as enzimas FastDigest Sall (Thermo Scientific™) e FastDigest NcoI (Thermo Scientific™) e os resultados foram analisados por eletroforese.

Após confirmação da clonagem e transformação, o plasmídeo construído foi utilizado para transformar as linhagens de *E. coli* K-12 MG1655, BL21(DE3), Rosetta e W.

3.6 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

A linhagem de *E. coli* DH5α foi selecionada para os procedimentos de clonagem (construção de plasmídeos de expressão) e ensaios iniciais de produção. Para o cultivo desta bactéria foi utilizado o meio LB composto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl, e as células foram incubadas a 37°C e agitação de 230 rpm.

Para o cultivo das linhagens de *E. coli* transformadas com o plasmídeo recombinante

(DH5 α , K-12 MG1655, Rosetta, BL21(DE3) e W) foi utilizado o meio LB suplementado com 10 g/L de glicose, 80 μ g/mL de ampicilina e 0,4 g/L de L-tirosina. Além disso, foi feita a suplementação do meio com 20 μ g/mL de CuSO₄. As células foram incubadas sob agitação de 230 rpm e temperatura de 30°C em frascos aletados por 96 horas após a indução com IPTG 1 mM.

Com o objetivo de avaliar o comportamento da DH5 α e otimizar o processo, foram realizados testes variando a fonte de carbono, glicose e glicerol (10 g/L), a concentração de IPTG (0,25 mM, 0,5 mM e 1,0 mM) para verificar qual seria a mais adequada, e o momento ideal para a indução com DO600 nos valores de 0,6; 1; e 2, sob as mesmas condições de cultivo anteriores.

3.7 Análise do perfil de crescimento celular e produção de melanina

Após a obtenção das células transformadas, foram conduzidos experimentos para avaliação da síntese de melanina e do perfil de crescimento celular das linhagens produtoras. Os cultivos foram realizados em triplicata em frascos Erlenmeyer aletados incubados sob condições controladas de temperatura e agitação. Para isso, as células armazenadas em glicerol foram inoculadas overnight em 5 mL de meio LB contendo ampicilina 50 μ g/mL em tubos de 50 mL. Em seguida, alíquotas de 1 mL dessa cultura foram transferidas para 50 mL de meio de cultura em frascos aletados de 250 mL, e IPTG 1,0 mM foi adicionado ao meio de cultura no começo da fase exponencial de crescimento, com a DO de 0.8.

Amostras do cultivo foram retiradas periodicamente para acompanhar o perfil de crescimento das células e da produção de melanina. Para o crescimento celular, foi feita a leitura da densidade óptica a 600 nm antes e após a centrifugação das amostras coletadas. A diferença na leitura se relaciona com o crescimento celular, já que a melanina no sobrenadante também absorve a 600 nm.

Já para a quantificação da melanina, amostras do sobrenadante foram analisadas no espectrofotômetro a 400 nm e correlacionadas com uma curva de calibração, conforme descrito

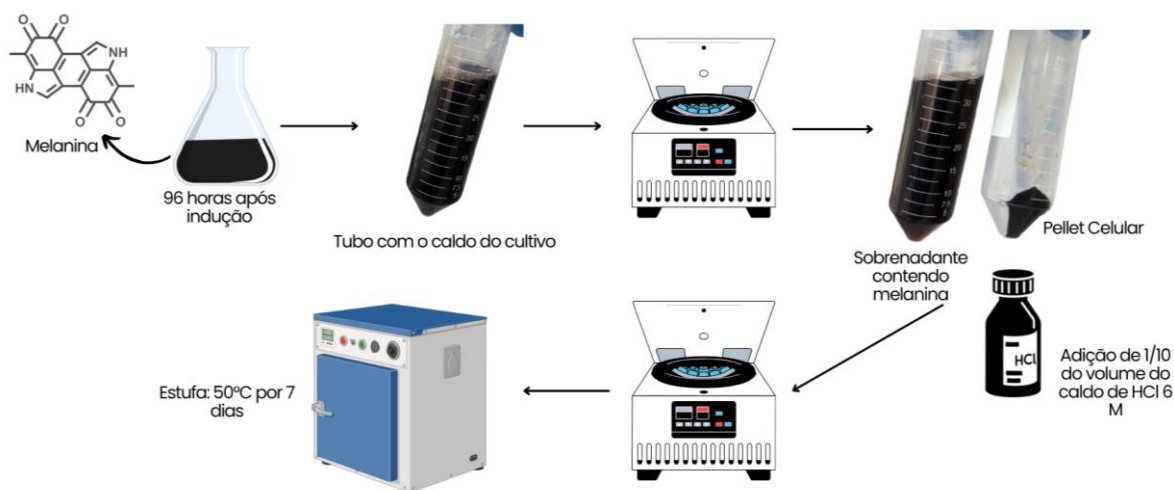
3.8 Curva de calibração para melanina

Para a construção da curva de calibração de melanina, foi preparada uma solução-mãe, a partir da melanina obtida do cultivo das linhagens transformadas, a 0,06 g/L em água destilada e adição de NaOH (até pH 11). Assim, realizaram-se diluições sucessivas de modo a se obter as concentrações de 0,060; 0,030; 0,015; 0,0075 e 0,00375 g/L.

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 400 nm. Os resultados experimentais de absorbância foram plotados em função da concentração, permitindo o ajuste linear por regressão de mínimos quadrados.

3.9 Extração da melanina

Após o término do cultivo, as células foram removidas por centrifugação, e o pellet celular foi descartado. A melanina do sobrenadante foi precipitada pela adição de 1/10 do volume de HCl 6 M. O precipitado obtido foi lavado repetidamente com água destilada até atingir pH neutro e, em seguida, armazenado em estufa a 50°C por 7 dias², resultando na melanina seca, a qual foi raspada e pesada, conforme esquema representado pela figura 5.



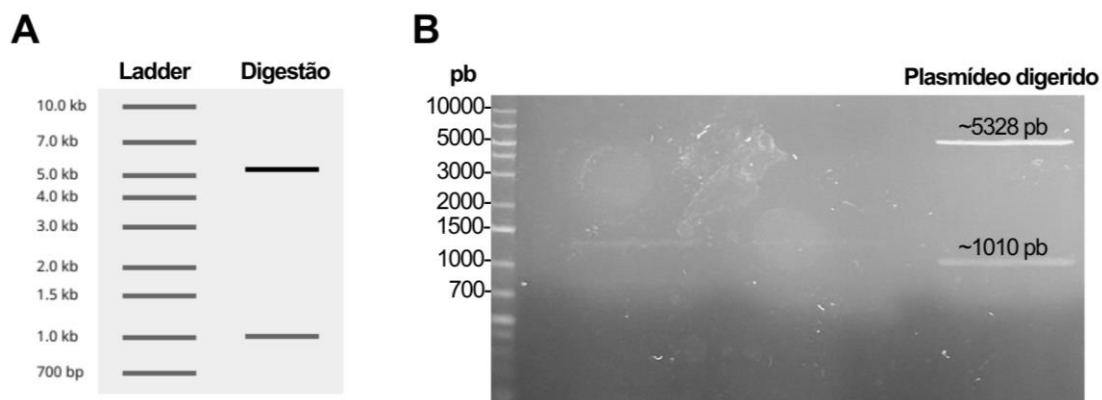


Figura 7. (A) Ensaio de digestão do plasmídeo pETM7_melBt simulado no “Benchling” com as enzimas NcoI e Sall, formando um fragmento de 5328 pb e um fragmento de 1010 pb. (B) Resultado do gel de agarose em luz UV para o ensaio de restrição, no qual verifica-se duas bandas (5328 e 1010 pb), confirmando a clonagem e transformação. Fonte: Autoria própria.

4.2 Curva de calibração da melanina

A melanina produzida em um dos cultivos foi utilizada para preparação de uma curva de calibração, conforme descrito na seção “Materiais e Métodos”, e a curva obtida pode ser observada na figura 8.

A equação da reta obtida foi:

$$A = 8,46 \cdot C + 0,00387 (R^2 = 0,99)$$

Em que A corresponde à absorbância medida e C à concentração de melanina em g/L. Esta equação foi utilizada para a determinação das concentrações desconhecidas a partir dos valores de absorbância experimental.

Curva de calibração da melanina

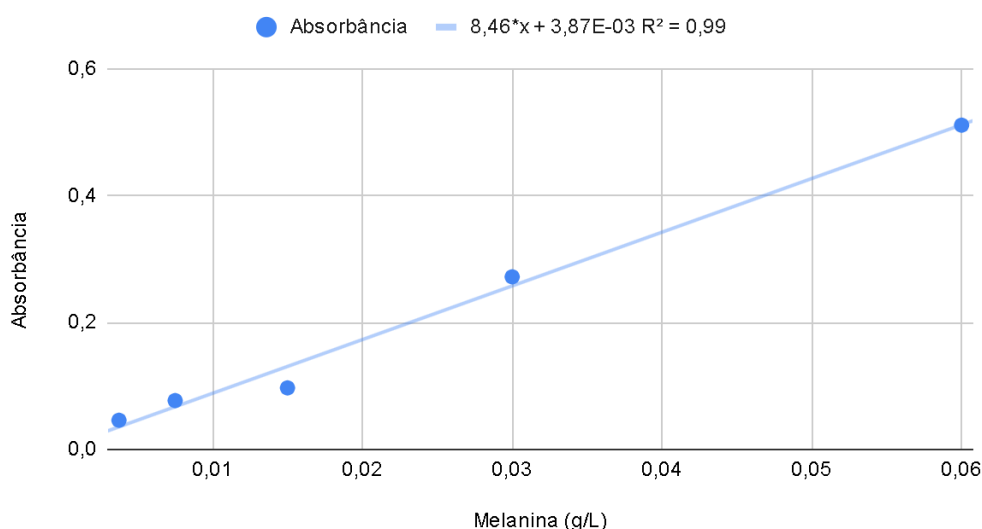


Figura 8. Gráfico ilustrando a curva de calibração da melanina. Fonte: Autoria própria.

4.3 Análise do crescimento celular e da expressão de tirosinase para a produção de melanina por linhagens recombinantes de *E. coli*

Um cultivo em triplicata foi conduzido com frascos aletados, que garantem uma maior oxigenação ao meio, o que se faz necessário visto que é necessário oxigênio para a formação de melanina através da tirosinase, assim as linhagens W, DH5 α , BL21(DE3), Rosetta e K-12 MG1655 foram inoculadas e cultivadas, como descrito em “Materiais e Métodos”.

O gráfico relacionando a densidade óptica (DO) com o crescimento celular pode ser verificado na figura 9(A), onde observa-se uma diferença significativa entre os perfis de crescimento das linhagens avaliadas. A linhagem K-12 MG1655 apresentou a menor velocidade de crescimento após 24 h de cultivo e também o menor valor final de DO. Já as linhagens BL21(DE3) e Rosetta registraram as velocidades mais altas de crescimento nas primeiras 24 horas, e atingiram valores finais de DO intermediários e muito semelhantes entre si. Enquanto isso, as linhagens DH5 α e W apresentaram velocidades de crescimento semelhantes no início do cultivo, mas a linhagem W atingiu o maior valor de DO final, enquanto a DH5 α chegou a um valor intermediário e semelhante à Rosetta e BL21(DE3).

Já para a quantificação da melanina, os sobrenadantes das amostras foram analisados no espectrofotômetro a 400 nm e correlacionados com uma curva de calibração, conforme descrito

²³. Na figura 9(B), observa-se a concentração de melanina em g/L conforme o tempo de cultivo, apresentando o ponto de absorbância mais alto no tempo de 72 horas.

O experimento foi conduzido para verificar como o genoma de cada linhagem pode influenciar na síntese de biomoléculas, nesse caso a melanina, já que as diferenças de regulação e expressão gênica entre as diferentes linhagens costuma ter um impacto significativo na produtividade, rendimento e concentração final de produtos metabólicos³⁵. Assim, foi confirmada essa variação, uma vez que as linhagens atingiram concentrações de 1,94; 0,26; 1,75; 1,01; 0,035 g/L de melanina para as linhagens BL21(DE3), W, Rosetta, DH5 α , K-12 MG1655, respectivamente.

Dessa forma, observou-se um perfil interessante relacionando a produção de melanina e as diferentes linhagens avaliadas, e confirmou-se que há uma grande diferença entre elas, sendo que as que mais se destacaram foram: BL21(DE3), DH5 α e Rosetta. Segundo relatado por Monk e colaboradores (2015), essas linhagens estão relacionadas com uma maior capacidade de síntese de tirosina, devido a capacidade de direcionamento do fluxo metabólico para a via do chiquimato³⁵. Apesar de compartilharem um genoma similar, suas diferenças provocam um estado metabólico diferente, de forma que afetam o crescimento, fluxo de carbono e expressão gênica. Assim, a BL21(DE3), Rosetta e DH5 α se mostraram mais capazes de metabolizar a tirosina, devido à expressão elevada de vias ligadas à essa molécula³⁵, que é precursora da melanina.

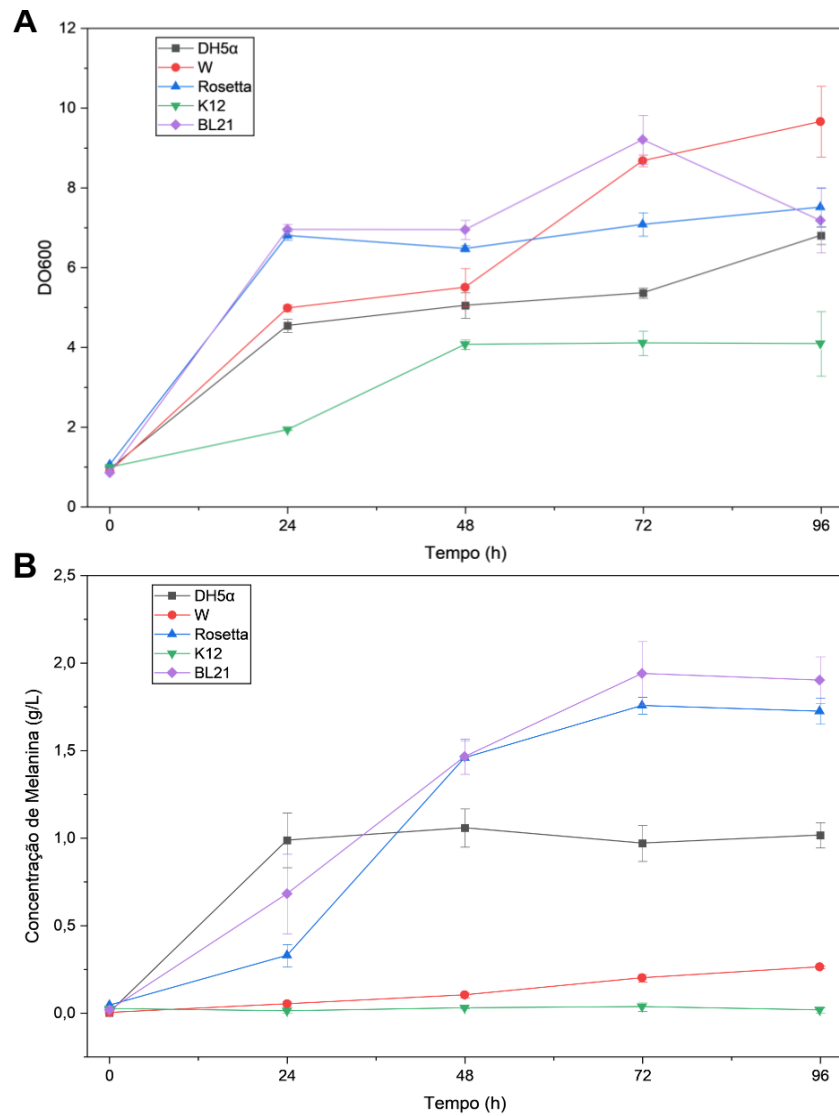


Figura 9. (A) Curvas de crescimento após a indução e (B) Concentração de melanina produzida pelas linhagens *E. coli* DH5α, W, BL21(DE3), K-12 MG1655 e Rosetta, quantificada a partir da curva de calibração elaborada nesse projeto. Fonte: Autoria própria.

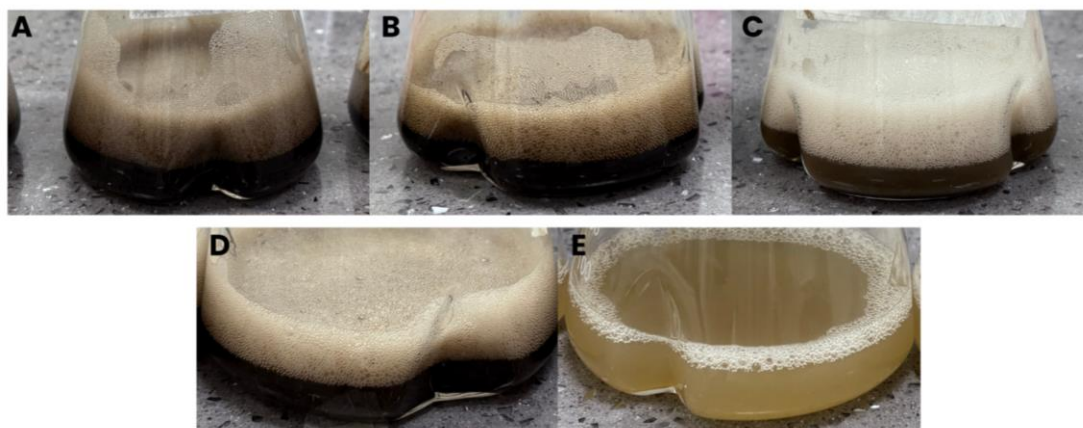


Figura 10. Comparação ilustrando cultivo após 96 horas (A) DH5 α , (B) BL21(DE3), (C) W, (D) Rosetta, (E) K-12 MG1655. Fonte: Autoria própria.

Finalmente, conclui-se que foi possível obter cinco linhagens produtoras de melanina, com algumas capazes de produzir altas concentrações para um cultivo de 50 mL. Para efeitos de comparação, o trabalho de Chávez-Béjar et al., (2013)²⁴ relatou a obtenção de 0,155 g/L de melanina por células de *E. coli* W3110 transformadas com um plasmídeo contendo os genes *Mutmela*, *aroGfbr*, *tyrC*, *pheACM* e deleção para gene *ΔtyrR*, em condições semelhantes. Sendo assim, comprovou-se a necessidade de um estudo a fundo sobre qual linhagem deve ser escolhida para se obter rendimentos maiores. Neste experimento, por exemplo, comparando a produção da BL21(DE3) com a W, vimos uma produção 7 vezes maior de melanina final pela linhagem de *E. coli* BL21(DE3).

Como houve dúvida sobre a síntese de melanina pela linhagem K-12 MG1655, realizou-se uma PCR com os plasmídeos extraídos desta linhagem e também da W e da DH5 α para confirmar a presença do gene da tirosinase, e o resultado positivo é apresentado na Figura 11.

A linhagem DH5 α é muito utilizada para realização de transformações usando vetores recombinantes por apresentar alta eficiência de transformação e estabilidade genética, mas não costuma ser utilizada como linhagem para expressão de proteínas heterólogas ou produção de outros bioprodutos. No entanto, por possuir uma produção intracelular alta de tirosina³⁵ e ter apresentado um bom nível de síntese de melanina, ela foi escolhida para os passos seguintes deste trabalho. Já a linhagem Rosetta é derivada da BL21(DE3), com a diferença de carregar um plasmídeo que fornece tRNAs para códons raros. Como ambas apresentaram resultados muito semelhantes, o plasmídeo adicional da Rosetta parece não ter apresentado efeito significativo na produção de melanina a partir da expressão da tirosinase de *B. thuringiensis*.

Por isso, entre as duas, apenas a BL21(DE3) foi selecionada para as etapas seguintes do trabalho.

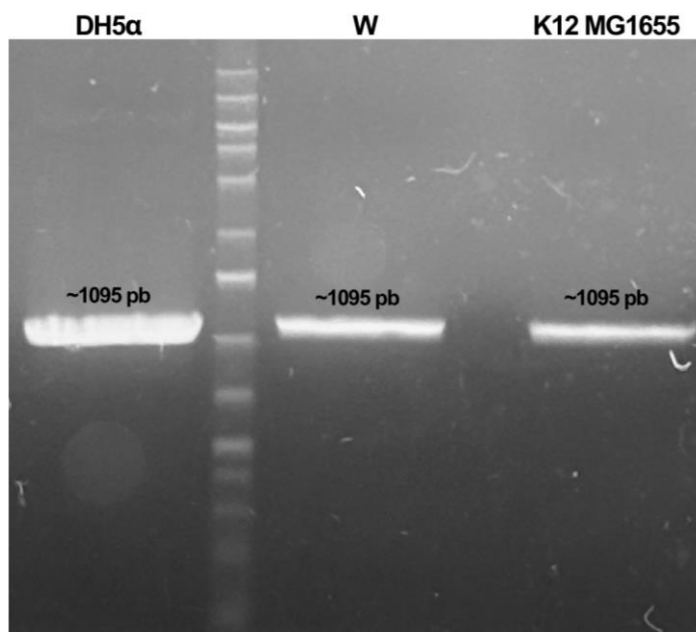


Figura 11. Gel de agarose com a amplificação do gene *melBt* a partir dos plasmídeos extraídos das linhagens transformadas de DH5α, W e K-12 MG1655. Fonte: Autoria própria.

4.4 Produção de melanina a partir de glicerol ou glicose

Com o objetivo de otimizar o processo de síntese de melanina foi realizado um teste da fonte de carbono utilizando duas das melhores linhagens de *E. coli* dos experimentos anteriores, a BL21(DE3) e DH5α. Então, utilizou-se de glicose e glicerol (10 g/L) para definir qual fonte de carbono seria mais favorável para a produção de melanina.

O glicerol é um subproduto da reação de transesterificação para formação de biodiesel, por isso a utilização desse substrato como fonte de carbono para diferentes cultivos é de interesse biotecnológico. Além disso, como verificado na literatura^{36,37,38} pode haver uma vantagem de maior obtenção de biomoléculas com o uso de glicerol quando comparado ao uso de glicose, e isso acontece, entre outros motivos, porque o glicerol apresenta um alto grau de redução. Além disso, o glicerol entra no metabolismo por duas vias: glicerol desidrogenase e glicerol quinase³⁹.

Na figura 12(A) encontra-se a curva de crescimento para as 4 condições, em que verifica-se que em 24 horas a DO atingiu seu pico e se estabilizou em aproximadamente 7 unidades de DO600.

A curva de concentração de melanina pode ser visualizada na figura 12(B), e um resultado promissor pode ser observado, principalmente, na produção pela DH5 α suplementada com glicerol, a qual apresentou, aproximadamente, 2 g/L de melanina no sobrenadante.

Portanto, confirmou-se que o glicerol pode ser uma ótima fonte de carbono, uma vez que proporcionou altas taxas de crescimento para as duas linhagens testadas (BL21(DE3) e DH5 α) e manteve altas concentrações de melanina produzida, sendo que para a DH5 α houve um aumento considerável em sua produção. Além disso, trata-se de uma fonte barata comparada à glicose, o que é essencial para o escalonamento industrial. Dessa forma, os experimentos seguintes passaram a ser realizados com 10 g/L de glicerol como fonte de carbono.

Além disso, constatou-se que não há grande incremento na síntese de melanina entre 72 e 96 horas. Por isso, para os próximos experimentos fixou-se o fim do cultivo em 72 horas. Na literatura observa-se um padrão de tempos elevados de cultivo como observado no Quadro 1. Com isso, uma produção com duração menor se mostra um avanço e uma forma de otimização para o processo de obtenção da melanina.

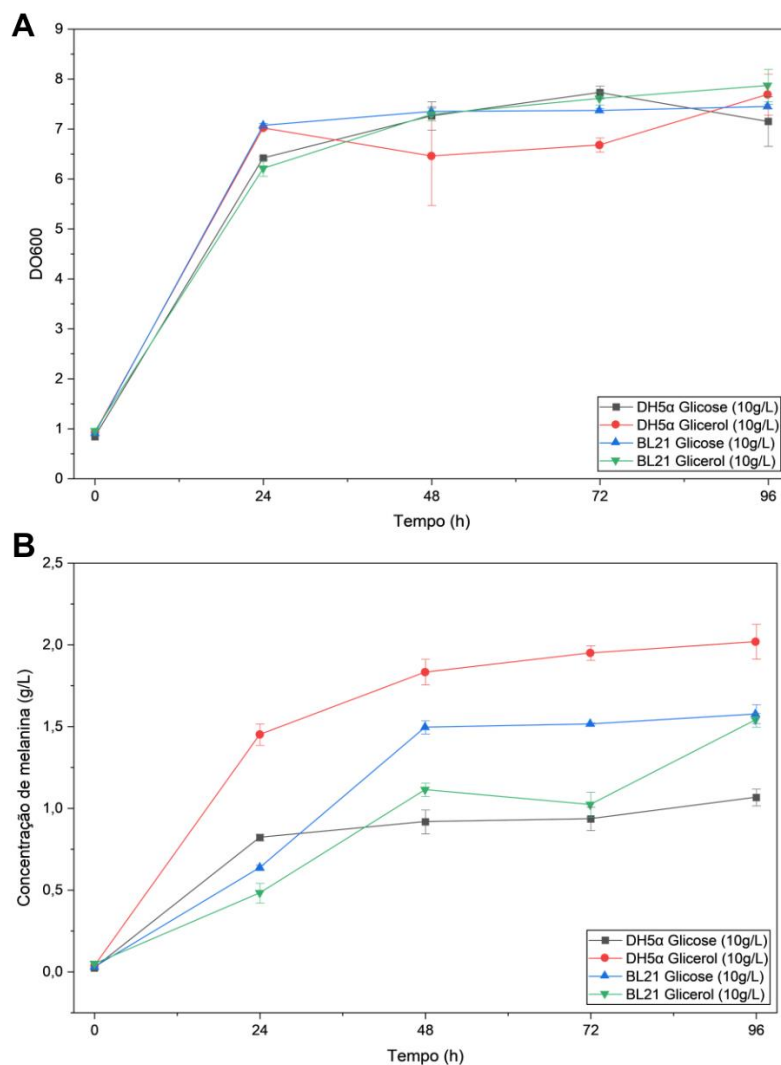


Figura 12. (A) Comparação entre o crescimento celular da linhagem DH5α e BL21(DE3) em meios suplementados com glicose (10 g/L) ou glicerol (10 g/L). (B) Comparação da concentração de melanina (g/L) produzida a partir desses mesmos cultivos. Fonte: Autoria própria.

4.5 Avaliação do efeito da concentração de IPTG

O uso do IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) é necessário para a indução da expressão do gene que codifica para tirosinase, essencial para o processo de produção da melanina heteróloga. Contudo, devido ao seu alto custo se torna relevante um estudo para verificar a concentração mínima necessária desse reagente.

Dessa forma, foi realizado um cultivo onde variou-se a concentração em 0,25 mM, 0,5 mM e 1mM de IPTG usada na indução. Na figura 13 observa-se a curva de crescimento, na qual verifica-se uma diferença mínima comparando as três concentrações. Além disso, a

concentração obtida de melanina durante o processo também se mostra similar, com um desvio padrão das três concentrações de apenas 0,036 g/L no ponto de retirada nas 72 horas de cultivo.

Ademais, um estudo estatístico com um único fator (oneway) foi realizado para verificar se houve diferença significativa entre essas condições. No Quadro 4, verifica-se a tabela ANOVA para esse estudo, de forma que constatou-se um $f_0 = 0,018$ e $F_{2,6}(\alpha = 10\%) = 3,46$, portanto rejeita-se H_0 . Ou seja, rejeita-se a hipótese de que houve diferença entre as concentrações finais, não havendo diferença significativa no uso de 0,25, 0,5 e 1 mM de IPTG para síntese de melanina nas condições avaliadas.

Tabela ANOVA

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F0	f2,6, 0.1
Tratamento	2	0,0076	0,0038	0,0178	3,46
Erro	6	1,291	0,215		
Total	8				

Quadro 4. Tabela ANOVA (n = 3). Fonte: Autoria própria

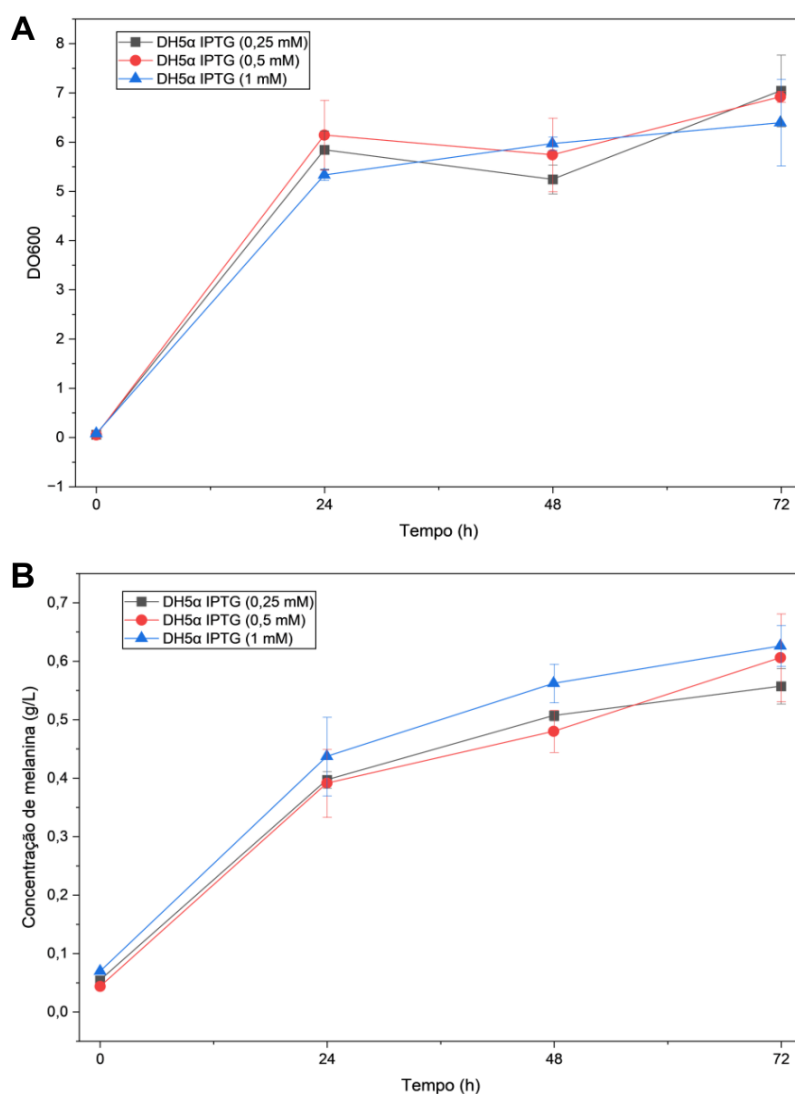


Figura 13. (A) Crescimento celular da linhagem DH5α induzida com diferentes concentrações de IPTG (0,25 mM, 0,5 mM e 1mM). (B) Concentração de melanina (g/L) produzida nas diferentes concentrações de indutor. Fonte: Autoria própria.

4.6 Avaliação do efeito do momento da indução

Uma etapa importante em experimentos de produção de biomoléculas por microrganismos recombinantes é conhecer o melhor momento para se realizar a indução. Por isso, para avaliar o comportamento da DH5α produtora de melanina, foi realizado um teste de indução com 0,25 mM de IPTG com DO600 nos valores de 0,6; 1; e 2.

Com intuito de garantir uma maior reprodutibilidade dos experimentos, a partir deste ensaio adotou-se um protocolo padronizado de preparação do inóculo. Primeiramente, um pré-inóculo com 5 mL de meio LB foi realizado em tubos falcon de 50 mL a partir do estoque permanente (linhagem DH5α e glicerol 40%). Então, após 16 horas de agitação em shaker a

230 rpm e 37 C, foi transferido o volume calculado para 0,1 de DO600 no erlen contendo 50 mL de meio LB fresco, que foi incubado sob as mesmas condições do pré inóculo. Em seguida, quando atingiu-se 1 unidade de DO600, 1 mL deste inóculo foi transferido para cada erlenmeyer com 50 mL de meio onde a síntese de melanina foi induzida nos valores de DO mencionados na descrição deste experimento.

A figura 14 traz os resultados obtidos sobre a curva de crescimento observada para esse teste, e além disso mostra a concentração de melanina obtida para os diferentes momentos de indução. No caso, é possível observar que tanto com relação à produção da melanina, quanto para o crescimento celular, a indução em diferentes estágios do crescimento não apresentou diferenças significativas; contudo observa-se que a indução em DO de 2 foi a menos favorável, uma vez que apresentou a menor concentração de melanina durante todo o cultivo. O fenômeno observado pode ser decorrente da alteração no metabolismo celular que a indução tardia pode causar. A indução em momentos de “mid-log” são mais benéficas comparadas à fases muito iniciais ou tardias, já que quantidades mais elevadas de proteína recombinante expressa levam a um impacto notável no metabolismo da célula hospedeira, detectável através do retardo do crescimento, além de estresse fisiológico, visto que a célula acaba transferindo muitos recursos para replicação do plasmídeo, transcrição do gene recombinante, dobramento da proteína, entre outros⁴⁰.

Com isso, o momento de indução ideal (entre os valores testados) para expressão da tirosinase está entre a DO600 0,6 e 1 que são valores muito utilizados para esse tipo de processo.

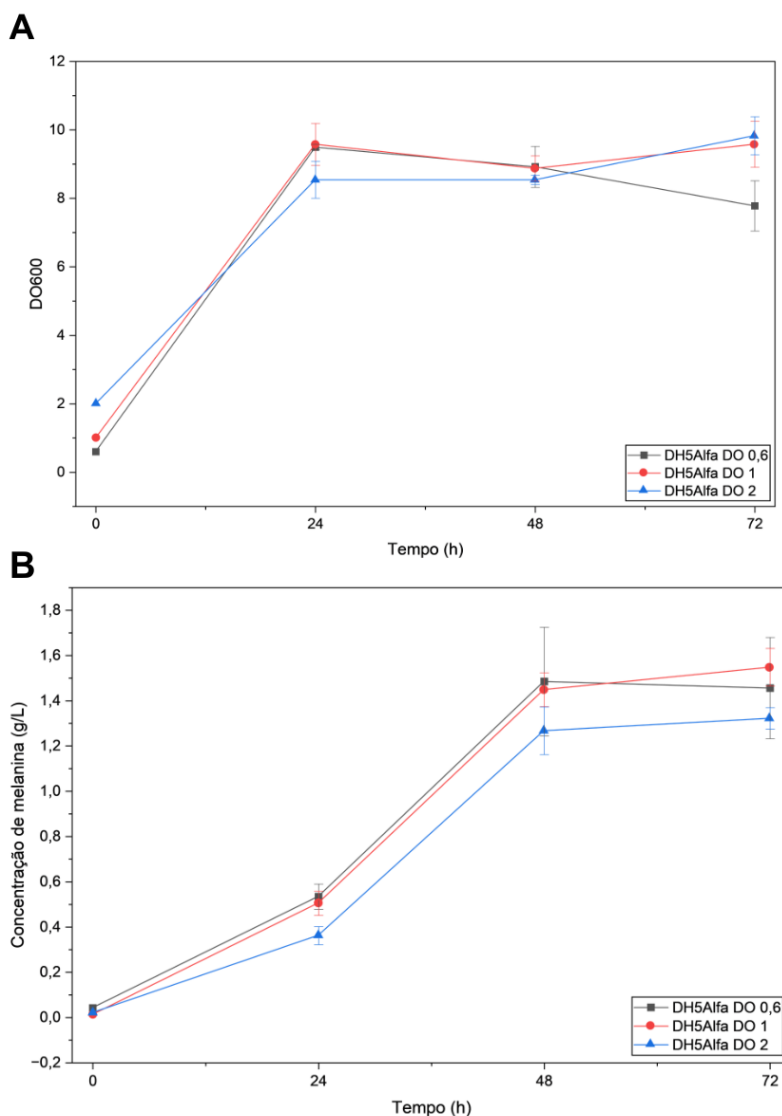


Figura 14. (A) Crescimento celular da linhagem DH5 α após a indução em diferentes momentos (DO600 de 0,6, 1,0 e 2,0). (B) Comparação da concentração de melanina (g/L) produzida a partir desses mesmos cultivos. Fonte: Autoria própria.

4.7 Efeito da suplementação de tirosina

A tirosina é precursor essencial para a síntese de melanina a partir da tirosinase codificada pelo gene *melBt*, e foi suplementada no meio de cultivo utilizado. No entanto, considerando que linhagens de *E. coli* produzem tirosina naturalmente, a síntese de melanina foi avaliada em um meio não suplementado com este aminoácido para fins de comparação. Assim, o cultivo foi realizado seguindo o protocolo anterior com a adição da etapa adicional do pré inóculo realizado no experimento no qual testou-se a DO de indução.

Na figura 15 visualiza-se a curva de concentração de melanina, onde observa-se que o cultivo em que houve a suplementação de tirosina produziu 3 vezes mais melanina comparado ao cultivo com a ausência de tirosina. Apesar da grande diferença na produção, é interessante notar que a linhagem recombinante foi capaz de produzir melanina mesmo sem suplementação de tirosina. Dessa forma, estudos que visem aumentar a síntese de tirosina pela própria *E. coli*, favorecendo rotas biossintéticas para aminoácidos aromáticos, podem ser desenvolvidos para otimizar a produção de melanina. Nesse sentido, a etapa seguinte deste trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da expressão conjunta de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos aromáticos em combinação com a expressão da tirosinase.

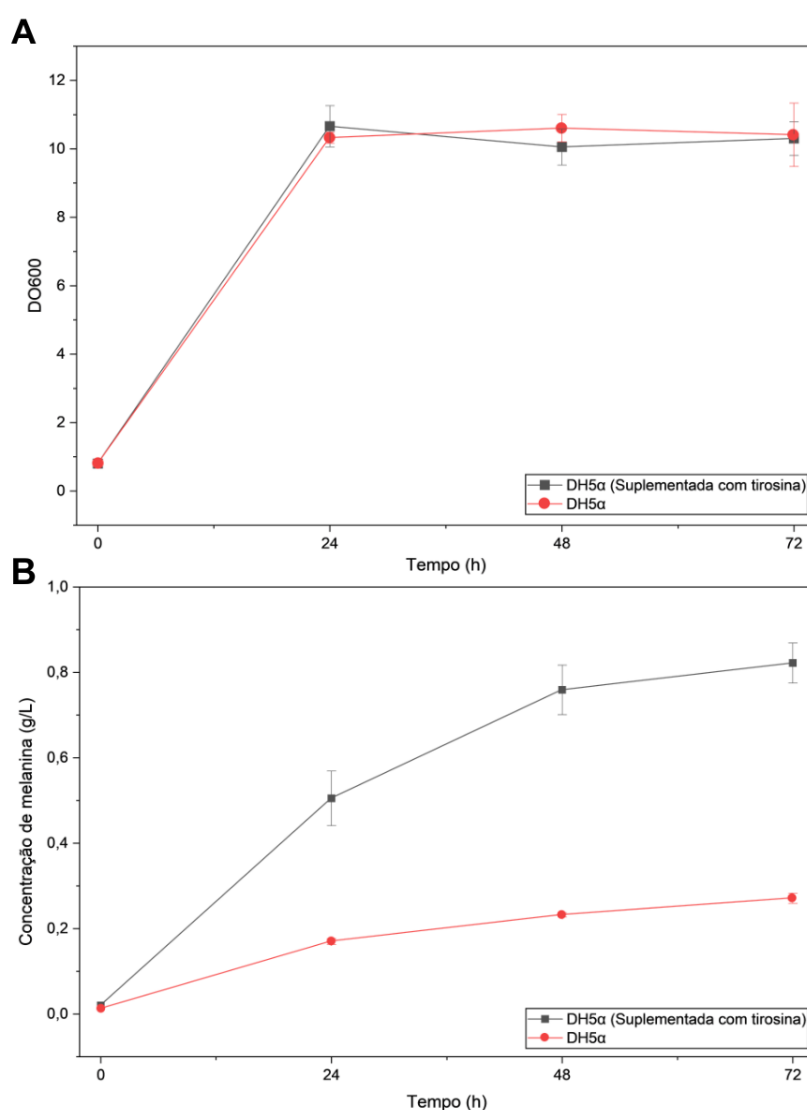


Figura 15. (A) Comparação do crescimento celular da linhagem DH5α, em meio LB + glicerol 10g/L suplementado com tirosina e sem suplementação de tirosina. (B) Comparação da concentração de melanina (g/L) produzida durante os cultivos com e sem suplementação de tirosina. Fonte: Autoria própria.

4.8 Avaliação de alvos genéticos adicionais para maior produção de melanina

A otimização do processo de produção de melanina pode ser abordada por engenharia genética de diversas maneiras, entre as quais, aumentar a disponibilidade do precursor (L-tirosina). Por isso, um conjunto de genes envolvidos na via de síntese de aminoácidos aromáticos, bem como um gene envolvido na captação de oxigênio, foram avaliados a partir de plasmídeos construídos em trabalhos do grupo de pesquisa relacionados à produção de outros compostos aromáticos. Dessa forma, os seguintes genes foram testados: *tktA* de *E. coli*, o qual codifica para uma enzima transcetolase da via das pentoses-fosfato, favorecendo a formação de eritrose-4-fosfato, precursor da via de compostos aromáticos^{41, 42}.

O gene *vhb50* de *Vitreoscilla*, conhecido por aumentar a captação de oxigênio da célula⁴³, devido a superexpressão de uma hemoglobina bacteriana. Como discutido anteriormente, a rota biossintética de melanina leva como precursor a tirosina e também passa por reações de oxigenação. Por isso, tanto frascos que garantem uma maior oxigenação do meio, como os aletados, quanto um gene que aumenta a captação de oxigênio, podem otimizar a síntese de melanina.

A via do chiquimato, ilustrada na figura 16, é o alvo comum quando se trata de trabalhos que foquem em produzir compostos aromáticos. Assim, o gene *aroD* de *E. coli*, o qual expressa a enzima 3-desidroquinato desidratase que catalisa a desidratação reversível do 3-desidroquinato em 3-desidrochiquimato, é um alvo de interesse. Estudos mostram que a superexpressão desse gene pode superar gargalos metabólicos que aumentam a formação de tirosina^{41, 44}.

Outro gene utilizado para esses testes foi o *aroE* de *E. coli*, o qual codifica para a chiquimato desidrogenase que também atua na via do chiquimato, sendo eficiente para aumentar a produção de tirosina. A superexpressão dessa enzima gera a redução da retroinibição do substrato chiquimato sobre a enzima⁴¹.

Após as transformações na linhagem DH5α dos plasmídeos contendo os alvos genéticos, realizou-se então um cultivo testando essas cepas transformadas para comparar o efeito da expressão destes genes na síntese de melanina, e os resultados são apresentados na figura 17. A curva de crescimento das cepas que continham o plasmídeo adicional não apresentaram um crescimento tão elevado quando comparamos com os cultivos realizados neste trabalho e com o próprio controle (linhagem DH5α expressando apenas o gene da tirosinase). A explicação

mais plausível para essa ocorrência se dá devido ao cultivo das cepas com o plasmídeo adicional serem realizados com dois antibióticos, Ampicilina e Canamicina. Além disso, é possível que a expressão destes genes adicionais cause algum tipo de sobrecarga metabólica nas células.

Na figura 16B, onde encontram-se os dados de concentração de melanina, as cepas com genes adicionais se mostraram eficazes para aumentar a concentração final do produto, uma vez que produziram aproximadamente 1,78 vezes mais que o controle. Este resultado indica que é eficaz a estratégia de aumentar a produção de tirosina intracelular para favorecer a formação de melanina, utilizando a superexpressão de genes relacionados à essa via. No entanto, as cepas com os plasmídeos adicionais apresentaram resultados similares, não sendo possível distinguir qual gene possui um efeito melhor nesse sentido.

Portanto, a expressão desses genes foi benéfica para o processo, aumentando a concentração final em comparação com o controle. Além disso, mostrou-se a importância da engenharia genética para a otimização da obtenção de bioprodutos, uma vez que o estudo das vias metabólicas pode revelar alvos efetivos para um aumento considerável na produção da biomolécula de interesse.

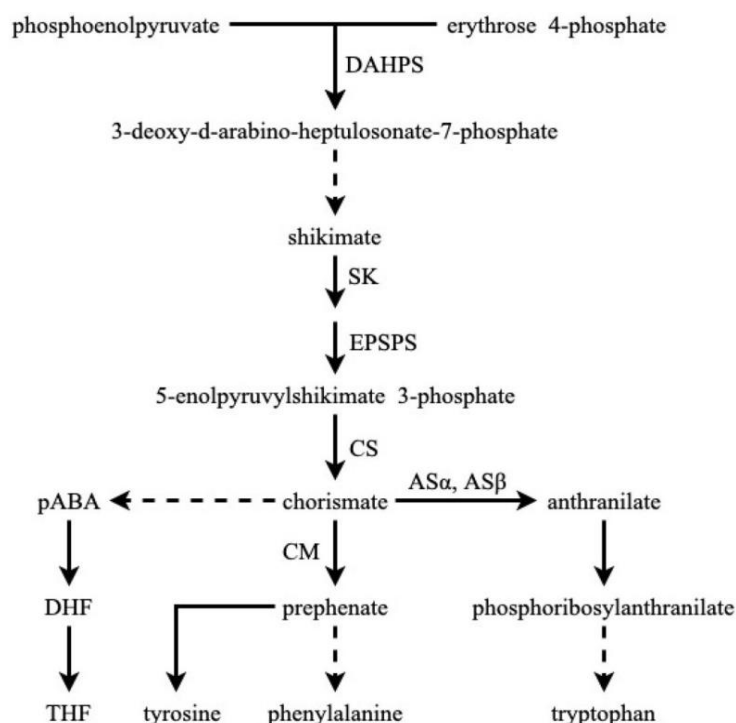


Figura 16. Via do chiquimato retirada da literatura⁴⁶

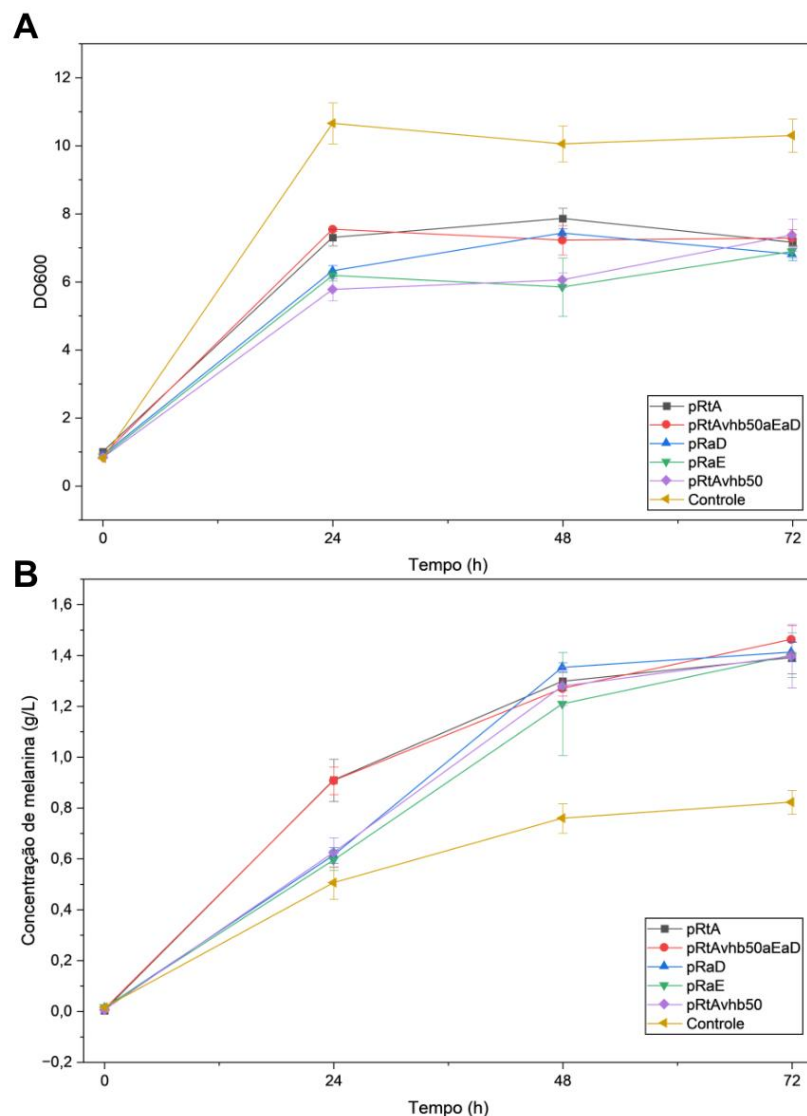


Figura 17. (A) Comparação do crescimento celular da linhagem DH5 α , em meio LB + glicerol 10g/L e as variantes transformadas com plasmídeos adicionais. (B) Comparação da concentração de melanina (g/L) produzida pelas diferentes linhagens durante o cultivo. Fonte: Autoria própria.

4.9 Extração da melanina

A extração foi realizada com base no método de precipitação ácida, como descrito em “Materiais e Métodos”. Na figura 18, estão representadas as etapas dessa extração por fotos, onde após a centrifugação do caldo do cultivo obtém-se o sobrenadante ao qual foi adicionado o HCl 6 M, e o pellet celular. Com isso, foi possível coletar 0,58 gramas de melanina em 450 mL de cultivo total (somando as triplicatas de 50 mL). Dessa forma observa-se que houve uma perda de material durante a extração, quando comparado com as concentrações esperadas medidas pela absorbância, e por isso se faz necessário um aprimoramento da extração. Além

disso, o pellet celular se mantém escuro após a centrifugação, e esse resultado sugere a presença de melanina intracelular, a qual não foi recuperada, indicando a possibilidade de aprimorar o protocolo visando também a obtenção dessa fração do pigmento.

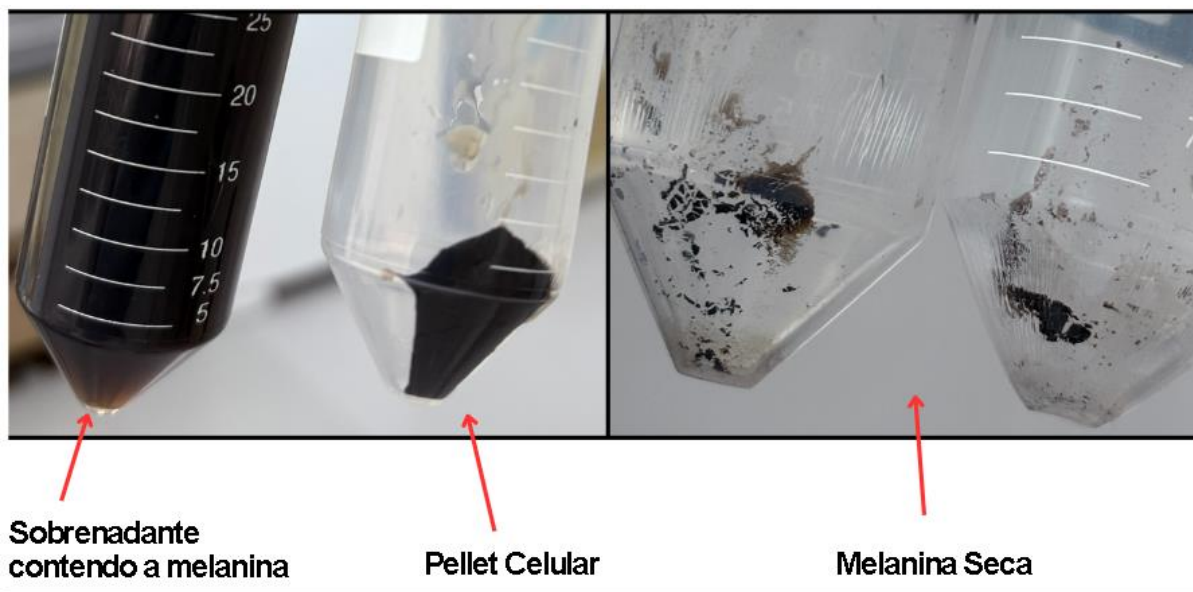


Figura 18. Imagens das etapas de extração da melanina. Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÃO

Durante o projeto foi possível obter diferentes linhagens produtoras de melanina, uma vez que o gene *melBt* de *B. thuringiensis* foi clonado com sucesso na *E. coli* DH5 α , BL21(DE3), Rosetta, K-12 MG1655 e W. Verificou-se através de cultivos o desempenho das cepas com relação aos perfis de crescimento celular e concentração máxima de produto, e os resultados confirmaram que cada linhagem possui uma diferença expressiva na produção de melanina já que, por exemplo, comparando a síntese da BL21(DE3) com a K-12 MG1655, vimos uma produção 54 vezes maior de melanina final pela linhagem de *E. coli* BL21(DE3).

Além disso, o trabalho permitiu a avaliação da influência de alguns parâmetros de processo na obtenção de melanina, como a fonte de carbono, a concentração de indutor, o momento de indução e a suplementação com tirosina. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o glicerol se mostrou mais favorável que a glicose como fonte de carbono, permitindo uma síntese de 2 g/L de melanina, e a suplementação do meio com tirosina levou uma concentração 3 vezes maior do produto de interesse. Já em relação às condições de indução, observou-se que a concentração de IPTG entre 0,25 e 1,0 mM levou a resultados semelhantes de produção, enquanto o momento da indução indicou que o valor de DO de 0,6 se mostrou mais favorável que as outras condições avaliadas.

Por fim, com intuito de otimizar o processo, os genes *tktA*, *aroD* e *aroE* de *E. coli*, que expressam enzimas envolvidas na formação de compostos aromáticos, foram expressos em conjunto com a tirosinase, e se mostraram todos favoráveis à formação do produto de interesse. O mesmo efeito positivo também foi observado para o gene *vhb50* de *Vitreoscilla*, que permite uma maior captação de oxigênio pelas células de *E. coli*. A expressão destes genes adicionais, individualmente ou combinados, levou a um aumento de até 1,78 vezes na produção de melanina em comparação com a linhagem expressando apenas a tirosinase. Este resultado, e o fato de todos os diferentes genes adicionais testados levarem a síntese de melanina para um mesmo patamar, levanta a hipótese de que outros fatores, tais como algum gargalo metabólico ou questões de toxicidade do produto acumulado, por exemplo, possam estar limitando a produção de melanina nas condições estudadas. Assim, estudos adicionais deverão ser realizados para confirmar ou não esta hipótese.

Ao final, o trabalho permitiu a obtenção de linhagens e condições de processo promissoras para a produção de melanina por células de *E. coli*, permitindo-nos atingir os objetivos propostos. A avaliação de outros parâmetros de processo, o estudo cinético detalhado da linhagem produtora, uma investigação mais aprofundada sobre o efeito dos genes adicionais

avaliados, realizar uma análise físico-química da melanina produzida e quantificar a tirosina que está sendo produzida podem ser realizados como etapas futuras para a continuidade deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Choi KY. Bioprocess of Microbial Melanin Production and Isolation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9. doi:10.3389/fbioe.2021.765110
2. Guo L, Li W, Gu Z, et al. Recent Advances and Progress on Melanin: From Source to Application. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4360. doi:10.3390/ijms24054360
3. Kurian, N. K., & Bhat, S. G. (2018). Data on the characterization of non-cytotoxic pyomelanin produced by marine *Pseudomonas stutzeri* BTCZ10 with cosmetological importance. *Data in Brief*, 18, 1889–1894. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2018.04.123>
4. KIM, K.-J. et al. Photothermally controlled drug release of naproxen-incorporated mungbean starch/PVA biomaterials adding melanin nanoparticles. *Process Biochemistry*, v. 129, p. 268–280, jun. 2023.
5. Pavan ME, López NI, Pettinari MJ. Melanin biosynthesis in bacteria, regulation and production perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(4):1357-1370. doi:10.1007/s00253-019-10245-y
6. Martínez LM, Martinez A, Gosset G. Production of Melanins With Recombinant Microorganisms. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7. Accessed November 15, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00285>
7. CAO, X. et al. Melanin-Integrated Structural Color Hybrid Hydrogels for Wound Healing. *Advanced Science*, v. 10, n. 22, 21 maio 2023.
8. KURIAN, N. K.; BHAT, S. G. Data on the characterization of non-cytotoxic pyomelanin produced by marine *Pseudomonas stutzeri* BTCZ10 with cosmetological importance. *Data in Brief*, v. 18, p. 1889–1894, jun. 2018.
9. KOEHLE, A. P. et al. Microbial applications for sustainable space exploration beyond low Earth orbit. *npj microgravity*, v. 9, n. 1, 21 jun. 2023.

10. MICHAEL, H. S. R. et al. Melanin biopolymers from microbial world with future perspectives—a review. *Archives of Microbiology*, v. 205, n. 9, 14 ago. 2023.
11. CHENG, X. et al. Systematic review on the full-process preparation, characterization and application of drug-loaded melanin nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 319, p. 145626, ago. 2025.
12. YANG, X. et al. Melanin: A promising source of functional food ingredient. *Journal of Functional Foods*, v. 105, p. 105574, 1 jun. 2023.
13. SONG, W. et al. Optimization of extractions of eumelanin from cuttlefish ink and the hypoglycemic effects: In vitro enzyme inhibitory activity and glucose consumption in HepG2 cells. *Journal of food processing and preservation*, v. 45, n. 10, 25 ago. 2021.
14. Snyman M, Walsdorf RE, Wix SN, Gill JG. The metabolism of melanin synthesis—From melanocytes to melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2024;37(4):438-452. doi:10.1111/pcmr.13165
15. Hida T, Kamiya T, Kawakami A, et al. Elucidation of Melanogenesis Cascade for Identifying Pathophysiology and Therapeutic Approach of Pigmentary Disorders and Melanoma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6129. doi:10.3390/ijms21176129
16. MATOBA, Y. et al. Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 13, p. 8981–8990, 25 jan. 2006.
17. Prados-Rosales R, Toriola S, Nakouzi A, et al. Structural Characterization of Melanin Pigments from Commercial Preparations of the Edible Mushroom *Auricularia auricula*. *J Agric Food Chem.* 2015;63(33):7326-7332. doi:10.1021/acs.jafc.5b02713
18. Schroeder RL, Double KL, Gerber JP. Using Sepia melanin as a PD model to describe the binding characteristics of neuromelanin – A critical review. *J Chem Neuroanat.* 2015;64-65:20-32. doi:10.1016/j.jchemneu.2015.02.001
19. Srisuk P, Correlo VM, Leonor IB, Palladino P, Reis RL. Redox activity of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis* by means of colorimetric oxidative assay. *Nat Prod Res.* 2016;30(8):982-986. doi:10.1080/14786419.2015.1079185

20. Tsouko E, Tolia E, Sarris D. Microbial Melanin: Renewable Feedstock and Emerging Applications in Food-Related Systems. *Sustainability*. 2023;15(9):7516. doi:10.3390/su15097516
21. El-Naggar NEA, Saber WIA. Natural Melanin: Current Trends, and Future Approaches, with Especial Reference to Microbial Source. *Polymers*. 2022;14(7):1339. doi:10.3390/polym14071339
22. della-Cioppa G, Jr SJG, Sverlow GG, Turpen TH, Grill LK, Chedekal MR. Melanin production from transformed *Escherichia coli*. Published online November 17, 1998. Accessed July 19, 2024. <https://patents.google.com/patent/US5837505A/en>
23. Lagunas-Muñoz VH, Cabrera-Valladares N, Bolívar F, Gosset G, Martínez A. Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*. 2006;101(5):1002-1008. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03013.x
24. Chávez-Béjar MI, Balderas-Hernandez VE, Gutiérrez-Alejandro A, Martinez A, Bolívar F, Gosset G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to optimize melanin synthesis from glucose. *Microb Cell Factories*. 2013;12(1):108. doi:10.1186/1475-2859-12-108
25. Wang Z, Tschirhart T, Schultzhau Z, et al. Melanin Produced by the Fast-Growing Marine Bacterium *Vibrio natriegens* through Heterologous Biosynthesis: Characterization and Application. *Appl Environ Microbiol*. 2020;86(5):e02749-19. doi:10.1128/AEM.02749-19
26. Guo J, Rao Z, Yang T, et al. Cloning and identification of a novel tyrosinase and its overexpression in *Streptomyces kathirae* SC-1 for enhancing melanin production. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362(8):fnnv041. doi:10.1093/femsle/fnnv041
27. Ribera, J., Panzarasa, G., Stobbe, A., Osypova, A., Rupper, P., Klose, D., et al. (2019). Scalable Biosynthesis of Melanin by the Basidiomycete *Armillaria Cepistipes*. *J. Agric. Food Chem.* 67, 132–139. doi:10.1021/acs.jafc.8b05071
28. Oh, J.-J., Kim, J. Y., Kwon, S. L., Hwang, D.-H., Choi, Y.-E., and Kim, G.-H. (2020). Production and Characterization of Melanin Pigments Derived from *Amorphotheca Resinae*. *J. Microbiol.* 58, 648–656. doi:10.1007/s12275-020-0054-z

29. Wang, L., Li, Y., and Li, Y. (2019). Metal Ions Driven Production, Characterization and Bioactivity of Extracellular Melanin from *Streptomyces* Sp. ZL-24. *Int. J. Biol. Macromolecules* 123, 521–530. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.061
30. Park, H., Yang, I., Choi, M., Jang, K.-S., Jung, J. C., and Choi, K.-Y. (2020a). Engineering of Melanin Biopolymer by Co-expression of MelC Tyrosinase with CYP102G4 Monooxygenase: Structural Composition Understanding by 15 Tesla FT-ICR MS Analysis. *Biochem. Eng. J.* 157. 107530. doi:10.1016/j.bej.2020.107530
31. Seo, D., and Choi, K.-Y. (2020a). Heterologous Production of Pyomelanin Biopolymer Using 4-hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Isolated from *Ralstonia Pickettii* in *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. J.* 157. 107548. doi:10.1016/j.bej.2020.107548
32. Ahn, S.-Y., Choi, M., Jeong, D.-W., Park, S., Park, H., Jang, K.-S., et al. (2019). Synthesis and Chemical Composition Analysis of Protocatechualdehyde-Based Novel Melanin Dye by 15T FT-ICR: High Dyeing Performance on Soft Contact Lens. *Dyes Pigm.* 160, 546–554. doi:10.1016/j.dyepig.2018.08.058
33. SILVA et al. Metabolic engineering of *E. coli* for pyocyanin production. v. 64, p. 15–25, 1 mar. 2021.
34. Xu P, Vansiri A, Bhan N, Koffas MAG. ePathBrick: A Synthetic Biology Platform for Engineering Metabolic Pathways in *E. coli*. *ACS Synth Biol.* 2012;1(7):256-266. doi:10.1021/sb300016b
35. Monk JM, Koza A, Campodonico MA, et al. Multi-omics Quantification of Species Variation of *Escherichia coli* Links Molecular Features with Strain Phenotypes. *Cell Syst.* 2016;3(3):238-251.e12. doi:10.1016/j.cels.2016.08.013
36. CHEN, Z.; LIU, D. Toward glycerol biorefinery: metabolic engineering for the production of biofuels and chemicals from glycerol. *Biotechnology for Biofuels*, v. 9, n. 1, 3 out. 2016.

37. OJIMA, Y. et al. Induction conditions that promote the effect of glycerol on recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Reports*, v. 46, p. e00898, 16 maio 2025.

38. KOPP, J. et al. Impact of Glycerol as Carbon Source onto Specific Sugar and Inducer Uptake Rates and Inclusion Body Productivity in *E. coli* BL21(DE3). *Bioengineering*, v. 5, n. 1, p. 1, 21 dez. 2017.

39. SUN, W.-J. et al. Characterization and engineering control of the effects of reactive oxygen species on the conversion of sterols to steroid synthons in *Mycobacterium neoaurum*. *Metabolic Engineering*, v. 56, p. 97–110, dez. 2019.

40. RAJACHARYA, G. H.; SHARMA, A.; YAZDANI, S. S. Proteomics and metabolic burden analysis to understand the impact of recombinant protein production in *E. coli*. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, 28 maio 2024.

41. PANTALEÃO, Vitor Leonel. Otimização da produção heteróloga de fenazina-1-ácido carboxílico por cepas recombinantes de *Escherichia coli*. 2025. 57 f. Trabalho de Graduação (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2025.

42. HUC CETOGULLARI, D.; LUO, Z. W.; LEE, S. Y. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. *Microbial Cell Factories*, v. 18, n. 1, 26 fev. 2019.

43. ARNALDOS, M. et al. Vitreoscilla hemoglobin enhances ethanol production by *Escherichia coli* in a variety of growth media. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p. 1–8, fev. 2012.

44. DARMAWI JUMINAGA et al. Modular Engineering of l -Tyrosine Production in *Escherichia coli*. v. 78, n. 1, p. 89–98, 1 jan. 2012.

45. XU, P. et al. ePathBrick: A Synthetic Biology Platform for Engineering Metabolic Pathways in *E. coli*. *ACS Synthetic Biology*, v. 1, n. 7, p. 256–266, 4 maio 2012.

46. ZHONG, S. et al. Suppression of chorismate synthase, which is localized in

chloroplasts and peroxisomes, results in abnormal flower development and anthocyanin reduction in petunia. Scientific reports, v. 10, n. 1, 2 jul. 2020.