



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PATRÍCIA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**BIOPROSPECÇÃO DE PIGMENTOS NATURAIS PRODUZIDOS POR FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DA CAATINGA.**

**SALVADOR**  
**2017**

**PATRÍCIA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**BIOPROSPECÇÃO DE PIGMENTOS NATURAIS PRODUZIDOS POR FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DA CAATINGA.**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para do título de doutora em Biotecnologia da RENORBIO/UFBA.

Orientador: Milton Ricardo de Abreu Roque

Co - orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

Salvador

2017

Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA

S586 Santos, Patrícia Oliveira  
Bioprospecção de pigmentos naturais produzidos por fungos  
endofíticos da Caatinga / Patrícia Oliveira Santos. - Salvador,  
2017.

124 f. : il.

Orientador: Milton Ricardo de Abreu Roque.  
Coorientadora: Ana Cristina Fermino Soares.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal da  
Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia, Salvador, 2017.

1. Pigmentos biológicos - Isolamento & purificação. 2. Fungos  
endofíticos - Penicillium. 3. Bioprospecção - Caatinga. 4.  
Planejamento experimental. 5. Produtos biológicos -  
Biotecnologia. I. Roque, Milton Ricardo de Abreu. II. Soares, Ana  
Cristina Fermino. III. Título.

CDU: 604



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**TERMO DE APROVAÇÃO**

A tese:

**BIOPROSPECÇÃO DE PIGMENTOS NATURAIS PRODUZIDOS POR  
FUNGOS ENDOFÍTICOS DA CAATINGA.**

Elaborada por:


**PATRÍCIA OLIVEIRA DOS SANTOS**

E aprovada por todos os membros da Banca de defesa de tese, como pré-requisito para obtenção do título de

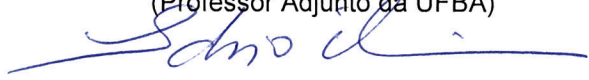
**DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA**


Salvador, 31 de janeiro, de 2017.

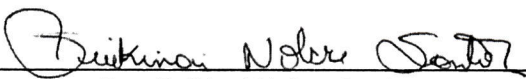
Banca examinadora:


  
Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

\_\_\_\_\_  
Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque  
(Professor Adjunto da UFBA)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fábio Alexandre Chinalia  
(Professor Adjunto da UFBA)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança  
(Professor Adjunto da UFRB)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Suikinai Nobre Santos  
(Pós – doc na Embrapa Meio Ambiente - SP)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Claudilene R. Chaves  
(Professora Adjunta da UFBA)

A Deus, que me deu força e coragem para vencer essa etapa da minha vida. Aos pesquisadores da Ciência e tecnologia, que não desistem de dedicar a sua vida em busca de conhecimento e inovação, essenciais ao crescimento deste país.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força e coragem para enfrentar todos os obstáculos, e acalmou minha alma em momentos de angústia.

A meu pai, pelo amor, apoio, incentivo, por comprar minha luta, por sempre acreditar em mim, e está sempre disponível para me ajudar em tudo que for preciso. Pelo notebook novo, para repor o meu novinho que o ladrão levou, esse deu muita sorte!

A minha mãe, e meu padrasto Carlos, pelas palavras de apoio, incentivo e pelos transportes de reagentes de última hora, para não atrasar o experimento.

A minha família, por conviver com a minha ausência e distância e ainda assim gostarem de mim, e pelo apoio afetivo.

A Tairone Damasceno, por me apoiar, por não deixar eu desistir, por me dar amor e carinho, me acalmar, por aguentar os meus estresses e doenças antes da qualificação e antes da defesa. Por ouvir horas sobre meu trabalho mesmo não sendo da área. Por me levar comida no laboratório e ir me buscar quando eu saia tarde da noite. Por acreditar no meu sucesso sempre.

A meu orientador Milton Roque, que iniciou minha carreira acadêmica desde da iniciação científica, oportunizando um estágio a uma menina tímida, que não tinha coragem nem para pedir a vaga, e teve que recorrer ao amigo Edgar Alvim para ser o interlocutor, outro que agradeço. Mais tarde me oportunizou fazer a seleção de doutorado, sabendo que seria uma orientação a distância e flexível, por conta da minha carga horária de trabalho, e ainda assim confiou no meu potencial.

Ao Professor Jorge Teodoro de Souza, que me ensinou muito durante o mestrado, no qual foi meu orientador, e continuou seu compromisso com a minha formação no doutorado, no qual contribuiu muito com ideias, disponibilizando acesso aos laboratórios e reagentes, e a coleção de cultura de fungos que deu origem ao desenvolvimento deste trabalho. Sempre acreditou e investiu no meu potencial, e devo a ele muito do meu crescimento profissional.

A professora Ana Cristina Fermino Soares, por ter aceitado a co – orientação da minha formação, contribuindo muito para meu crescimento profissional, acreditando no meu potencial. Por entender a minha situação de urgência em relação ao prazo de desenvolvimento do projeto e disponibilizar acesso aos laboratórios, recursos humanos (parcerias) e reagentes essenciais para desenvolvimento do trabalho. Por receber e autorizar o acesso aos laboratórios das minhas alunas de iniciação científica do IFBaiano, as quais também fazem parte do projeto.

Ao Professor Carlos Bragança, por me acolher na Clínica fitossanitária, e disponibilizar acesso irrestrito aos laboratórios e reagentes. Por discutir meus experimentos comigo e contribuir com ideias. Por aceitar fazer parte da minha banca de qualificação e defesa, sempre contribuindo para o trabalho. Por receber e autorizar o acesso aos laboratórios das minhas alunas de iniciação científica do IFBaiano, as quais também fazem parte do projeto.

A professora Caline Ferraz, por me ensinar a trabalhar com a química de produtos naturais e isolamento de moléculas. Por muito contribuir para o desenvolvimento desse trabalho. Por me orientar e realizar junto comigo a parte química deste trabalho. Pelas análises espectroscópicas realizadas junto ao LNBIO em São Paulo.

Ao Professor Fábio Chinalia, pelas preciosas contribuições ao trabalho, tanto na disciplina de Microbiologia Industrial, quanto na qualificação.

A professora Franceli da Silva, por disponibilizar acesso ao laboratório de Fitoquímica e autorizar o acesso aos laboratórios das minhas alunas de iniciação científica do IFBaiano, as quais também fazem parte do projeto.

Ao professor Phellippe Marback por me indicar o LAMIC para realizar teste de presença de toxinas.

Ao Professor Bezerra, profissional excelente na área de taxonomia de fungos, pessoa maravilhosa e sempre solícita, sempre disposto a ensinar, olhar lâminas, contribuir para o crescimento profissional de seus alunos e passar sua energia positiva.

Ao programa de Pós – graduação da RENORBIO, que por conta do seu sistema em rede, me proporcionou conhecer profissionais excelentes em diferentes Instituições do Nordeste, oportunizando conhecimento e crescimento. Gostaria de agradecer a esses Professores da RENORBIO de outros pontos focais, pelo acolhimento e ensinamentos. Aproveito para agradecer também os professores do Ponto Focal UFBA, pelos ensinamentos e as secretárias Jussi e Cláudia por serem sempre solícitas para resolver problemas e estarem sempre dispostas a orientar.

Aos colegas de curso, os quais fui conhecendo ao longo da jornada, sempre ajudando uns aos outros, passando informações essenciais, principalmente para mim que trabalho e moro em outra cidade, sendo solidários e solícitos, em especial a Fúlvia por sempre ajudar, inclusive com orientações cruciais para defender os interesses dos discentes do curso.

A minha amiga, colega de curso, e de orientação, Brena Mota. Tenho tanto a agradecer a essa pessoa maravilhosa, que nem sei por onde começar. Ela foi praticamente minha procuradora para resolver questões na secretaria quando eu não estava na cidade. Salvadora da pátria em relação as informações de disciplinas, de prazos e trabalhos. Companhia perfeita para as disciplinas ofertadas em outros

estados e para minha coleta, na qual ela foi só para me ajudar. Além de ser amiga para ouvir meus desabafos.

As companheiras do Laboratório Bioprospector (UFBA), Aldi, Carla Sampaio, e Carla Silveira, mesmo desenvolvendo o meu projeto em outros laboratórios e com pouco convívio neste laboratório, desenvolvemos uma amizade, sou muito grata pelo acolhimento, pela solicitude e alegria que sempre me trataram.

A Carolina Yamamoto, técnica de biologia da UFRB, integrante desse projeto, ex-colega e mestrado e minha amiga querida. Essa pessoa iluminada contribuiu de maneira efetiva no projeto, realizando comigo alguns experimentos e contribuindo com ideias. Mas meu agradecimento é especialmente pela companheira que és, sempre levantando minha auto-estima e tornando qualquer atividade mais leve, exemplo de humanidade e energia positiva.

Aos colegas dos Laboratórios de microbiologia, Fitoquímica e Clínica Fitossanitária: Lene, Fábio, Lica, Cris, Thiago, Beth, Thaise, Djalma, Simone, Sara, Mariane e Daniele. Gostaria de agradecer-los pela solicitude, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelas orientações no laboratório, pelos ensinamentos e os pequenos favores diários. Gostaria de agradecer, em especial a Silvane, por me ajudar nos experimentos relacionados a parte química, estar sempre disposta a ajudar, e ser minha companhia na fitoquímica inclusive nos feriados.

Aos colegas e amigos do IFBaiano, pelas palavras de incentivo, e torcida. A Rosineide, Nelson, Arlene, Marisela e Camila, por intercederem para que me fosse concedido o afastamento das minhas atividades como docente para que eu pudesse me dedicar apenas ao projeto de doutorado, e esse afastamento foi essencial para que eu pudesse me organizar e me recuperar depois do incidente que me fez perder os dados do projeto. As minhas amigas e companheiras de Residência no Instituto: Camila Brandão, Camilla Portela, Arlene, Elma, Cida e Patrícia Penna, meus sinceros agradecimentos, se tornaram minha família no IFBaiano. Pela parceria, palavras de incentivo, preocupação, paciência, por me alimentarem muito bem, pela compreensão, enfim, por cuidarem de mim, pois eu vivia esquecendo de tudo na minha correria.

A minha Mãe científica Suikinai, sim, foi com ela que comecei e aprendi as primeiras coisas do mundo da ciência. Foi com ela que aprendi a ser pesquisadora e conheci o mundo da microbiologia, isso a 11 anos atrás, e até hoje ela me acompanha e me ensina. Espetacular como pessoa e mais ainda como profissional, ela não me deixou desistir. Gastando horas e horas comigo no Skype, sempre me orientando mesmo de longe, seja em Londres, em São Paulo, de qualquer lugar do mundo ela sempre esteve presente.

A minhas queridas amigas microbiologistas também, Lidiane e Deborah, pela torcida e incentivo. Por estarem sempre se colocando à disposição para ajudar. As minhas



amigas Monique, Lorena, Michele e Nelma, pela amizade, por me darem força, me escutarem, e acalmarem minhas lágrimas.

A Aline Simões e Jackeline Andrade pela amizade, competência e contribuição direta para o desenvolvimento deste trabalho na parte de planejamento experimental.

A seu Cristino, que muito me ajudou tomando conta da minha casa, das minhas filhas pets tapioca e Luna, enquanto eu estava a semana toda pela estrada. Pessoa que me estendeu a mão no episódio do assalto, e saiu comigo na caçada dos meus dados, e me apoiou até o fim. Acredito que Deus coloca as pessoas certas, nos momentos certos, e certamente sem essa ajuda eu não teria conseguido.

A família Machado de Araújo, por ter me socorrido e ajudado no momento do acidente de carro e com as providências para a resolução desse problema, me acolhendo nesse momento difícil.

As minhas orientadas Taisiane e Ivoneide por se dedicarem, viajando para outra cidade a fim de aprender e contribuir diretamente para o projeto participando de alguns experimentos.

Aos vigilantes da Empresa Savanna que prestam serviço a UFRB, por sempre estarem disponíveis e solícitos para me acompanhar, fazendo a “escolta” do laboratório até a portaria quando eu ia embora para casa de madrugada.

A Luna, Tapioca e Tcharlie, meus filhos pets, meus companheiros da madrugada na escrita da tese. Compreensivos com a minha falta de tempo em muitos momentos dessa caminhada. Sempre companheiros e dando muito amor e carinho.

Finalmente e muito importante, a todos os meus amigos que contribuíram de forma direta ou indireta, torcendo por mim, me proporcionando momentos de lazer e descontração, e mandando muitas energias positivas. Se eu pudesse citava cada um nominalmente, porém a metade da tese seria só de agradecimentos.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

Pigmentos extraídos de fungos são uma alternativa promissora em relação aos corantes obtidos de animais e vegetais, não apresentam problemas de sazonalidade e podem ter sua produção otimizada e controlada. A primeira etapa deste trabalho foi isolar e obter cultura pura de fungos endofíticos de plantas do Bioma Caatinga. Foram obtidos 260 isolados, destes, 4 isolados foram selecionados, para a produção de pigmentos em meio de cultivo. Após a análise dos isolados quanto ao crescimento e a produção do pigmento, os isolados EARIM3A e EARIM9A foram selecionados por produzirem pigmentos com cor de interesse para indústria, amarelo e vermelho respectivamente e apresentaram boa produção em meio de cultura líquido. O isolado EARIM3A, foi identificado como pertencente ao táxon *Penicillium mallochii* e o EARIM9A como *Penicillium cairnesense*. As condições de produção de pigmento amarelo do isolado de *P. mallochii* foram otimizadas utilizando planejamento experimental do tipo DCCR com três variáveis: pH, temperatura e rotação. A produção do pigmento amarelo ocorreu em diferentes condições de cultivo: na faixa de pH (2,0 a 8,4); na temperatura de 24 °C a 30 °C; e foi capaz de produzir em condição estacionária, ou com rotação variando de 36 a 144 rpm. O pigmento foi incorporado tanto no micélio quanto liberado no meio de cultura. Do ensaio com a melhor produção do pigmento amarelo extracelular foi obtido 1,771 g/L de extrato bruto, e do pigmento endocelular 4,47 g/L. Dentre as condições testadas, a temperatura em 24°C, estacionária, e com pH 6 foi a condição ótima de cultivo de *P. mallochii* para a produção do pigmento amarelo. A estabilidade da cor foi testada frente a alterações de temperatura e exposição à radiação UV. Tanto com o extrato do pigmento amarelo, como com o pigmento vermelho não ocorreram alterações significativas na cor. Com relação a estabilidade do pigmento amarelo às alterações de pH, não houve mudança significativa na cor. O pigmento vermelho mudou para a cor amarela em pH 2 e 3. No extrato do pigmento amarelo não foram encontrados traços das micotoxinas Ácido penicílico, Citrinina e Patulina.

**Palavras-Chave:** Pigmento, *P. mallochii*, *P. cairnesense*, DCCR.

## ABSTRACT

Pigments extracted from fungi are a promising alternative for the dyes obtained from animals and plants, because they do not present problems of seasonality, and can have their production optimized and controlled. The first step of this work was to isolate and obtain pure culture of endophytic fungi from plants of the Caatinga Biome. In this work, 260 isolates were obtained, of which 4 isolates were selected for the production of pigments in culture medium. After analysis of the isolates for growth and pigment production, the isolates EARIM3A and EARIM9A were selected for producing pigments of color of interest for industry, yellow and red respectively and presented good production in liquid culture medium. The EARIM3A isolate was identified as belonging to the *Penicillium mallochii* taxon and EARIM9A as *Penicillium cairnesense*. The yellow pigment production conditions of the *P. mallochii* isolate were optimized using experimental design of the DCCR type with three variables: pH, temperature and rotation. The production of the yellow pigment occurred in different culture conditions: in the pH range (2.0 to 8.4); At a temperature of 24 ° C to 30 ° C; And was able to produce in stationary condition, or with rotation ranging from 36 to 144 rpm. The pigment was incorporated into both the mycelium and released into the culture medium. From the assay with the best production of the extracellular yellow pigment was obtained 1.771 g / L of crude extract, and of the endocellular pigment 4.47 g / L. Among the conditions tested, the temperature at 24 ° C, stationary, and at pH 6 was the optimal condition of *P. mallochii* cultivation for the production of the yellow pigment. The color stability was tested against changes in temperature and exposure to UV radiation. Both with the yellow pigment extract and with the red pigment there were no significant changes in color. Regarding the stability of the yellow pigment to pH changes, there was no significant change in color. The red pigment changed to yellow at pH 2 and 3. In the extract of the yellow pigment no traces of mycotoxins were found Penicillin acid, Citrinin and Patulin.

**Key words: Pigment, *P. mallochii*, *P. cairnesense*, CCRD.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Espectro eletromagnético da luz.....	22
Figura 2: Cores cromáticas que formam a parte visível do espectro da Luz e suas cores complementares vistas pelo olho humano.....	23
Figura 3: Exemplos de alguns corantes policetídeos, acompanhada da estrutura química, coloração e sua fonte.....	33
Figura 4: Matriz planejamento experimental completo do tipo Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR.....	41
Figura 5: Isolados selecionados na triagem inicial em placa.....	45
Figura 6: Resultado da produção de pigmento em meio líquido pelo isolado EARIM3A.....	48
Figura 7: Resultado da produção de pigmento em meio líquido pelo isolado EARIM9A.....	49
Figura 8: Resultado da produção de pigmento em meio líquido pelo isolado EARJU3E.....	49
Figura 9: Resultado da produção de pigmento em meio líquido pelo isolado ECMP2F3B.....	50
Figura 10: Obtenção de filtrado com o pigmento .....	51
Figura 11: Gráfico referente a varredura em espectrofotômetro (350 nm a 700 nm) realizada no filtrado do isolado EARIM3A, para a identificação da cor.....	52
Figura 12: Gráfico referente a varredura em espectrofotômetro (350 nm a 700 nm) realizada no filtrado do isolado EARIM9A, para a identificação da cor.....	52
Figura 13: Árvore filogenética Bayesiana construída com alinhamento de 67 sequências da região B-TUB das espécies de <i>Penicillium</i> obtidas no GenBank representativas das seções do gênero, e fragmento do isolado EARIM3A e EARIM9A obtidos neste trabalho. ....	54
Figura 14: Análise macromorfológica do isolado EARIM 3A.....	55
Figura 15: Fotomicrografias do isolado EARIM3A, (cultivado em meio MEA) em objetiva de 100x.....	56
Figura 16: Análise macromorfológica do isolado EARIM 9A .....	58
Figura 17: Fotomicrografias do isolado EARIM9A .....	59

Figura 18: Perfil químico do espectro de próton, RMN de  $^1\text{H}$  [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)], do extrato hexânico endocelular obtido do isolado EARIM3A..... 63

Figura 19: Espectro de próton obtido pela ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do extrato do isolado EARIM3A (pigmento amarelo) [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]. (A) Extrato obtido a partir da extração do pigmento extracelular da fase aquosa com *n*- Butanol. (B) Extrato obtido a partir da extração do pigmento endocelular com hexano..... 65

Figura 20: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de do extrato do isolado EARIM9A (pigmento vermelho) [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]. (A) Espectro obtido a partir da extração do pigmento do micélio com metanol. (B) Extrato obtido a partir da extração do pigmento da fase aquosa com *n*-butanol..... 67

Figura 21: Obtenção de extratos com o pigmento. (A) Partição da fase aquosa com o pigmento amarelo utilizando o solvente N – Butanol. (B) Partição da fase aquosa com o pigmento vermelho utilizando o solvente N – Butanol. (C) Solução de N-butanol com o pigmento. (D) extratos hexânico e de acetato de etila obtidos a partir da extração do pigmento amarelo do micélio. (E) Micélio com o pigmento amarelo pronto para a extração..... 67

Figura 22: Resultado do planejamento experimental DCCR completo, que mostra que o ensaio 1 obteve maior rendimento, indicando o pH 3,6, a temperatura 24°C, e a rotação 36 rpm como melhores condições de cultivo visando maior produção de pigmento..... 68

Figura 23: Comparação entre a biomassa (peso seco micélio  $\text{g.L}^{-1}$ ) e a produção do pigmento extracelular nos ensaios..... 70

Figura 24: Comparação entre a biomassa (peso seco micélio  $\text{g.L}^{-1}$ ) e a produção do pigmento do micélio nos ensaios..... 71

Figura 25: Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável significativa em função da temperatura, pH e rotação (Pigmento extracelular)..... 73

Figura 26: Superfície de resposta para a produção de pigmento em função das variações de temperatura e pH..... 75

Figura 27: Superfície de resposta para a produção de pigmento em função das variações de temperatura e rpm..... 76

Figura 28: Superfície de resposta para a produção de pigmento em função das variações de rpm e pH..... 76

Figura 29: Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável em função da temperatura, pH e rotação (Pigmento micélio)..... 78

Figura 30: Matriz planejamento experimental completo do tipo Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR 2 <sup>2</sup> .....	80
Figura 31: Ensaios do DCCR 2 <sup>2</sup> após 10 dias de cultivo.....	81
Figura 32: Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável em função do pH e rotação (DCCR 2 <sup>2</sup> ) (Pigmento micélio).....	82
Figura 33: Placas de CCDC com o extrato hexânico do isolado EARIM3A.....	88
Figura 34: Separação do extrato hexânico de EARIM3A por coluna filtrante.....	89
Figura 35: Placas de CCDC com as frações obtidas na separação em coluna utilizando o sistema de solvente hexano 70% : acetato de etila 30%.....	90
Figura 36: Placas de CCDC com as frações obtidas na separação em coluna utilizando o sistema de solvente hexano 90% : acetato de etila 10%.....	90
Figura 37: Placas de CCDC com as frações obtidas na separação em coluna utilizando o sistema de solvente hexano 90% : metanol 10%.....	91
Figura 38: Placas de CCDC com as frações obtidas na separação em coluna utilizando o sistema de solvente hexano 80% : metanol 20%.....	91
Figura 39: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da fração 17 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ (ppm).....	92
Figura 40: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da fração 19.2 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ(ppm).....	92
Figura 41: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da fração 20.1 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo.....	93
Figura 42: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da fração 22.1 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo.....	93
Figura 43: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da fração 25.1 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ(ppm).....	94
Figura 44: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da fração 28.2 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo.....	95
Figura 45: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da fração 32.2 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo.....	95
Figura 46: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da fração 35 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ(ppm).....	96

Figura 47: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração 36 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm).....	96
Figura 48: Resultados do teste de estabilidade do pigmento amarelo as alterações de temperaturas da autoclavagem, fervura e congelamento, e a exposição à radiação UV.....	97
Figura 49: Resultados do teste de estabilidade do pigmento vermelho as alterações de temperaturas da autoclavagem, fervura e congelamento, e a exposição à radiação UV.....	98
Figura 50: Comparação qualitativa da cor do pH 2 ao 10. (A) pigmento amarelo produzido pelo isolado EARIM3A. (B) pigmento vermelho produzido pelo isolado EARIM9A.....	100
Figura 51: Gráfico mostrando a variação da O.D. da solução com pigmento amarelo em função da variação de pH.....	101
Figura 52: Gráfico mostrando a variação da O.D. da solução com pigmento vermelho em função da variação de pH.....	101
Figura 53: Recorte do laudo com o resultado na análise de presença de micotoxinas no extrato do pigmento produzido por <i>P. mallochii</i> .....	103

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais corantes naturais encontrados na natureza.....	25
Tabela 2: Espécies fúngicas produtoras de pigmento.....	31
Tabela 3: Composição dos meios de cultura.....	36
Tabela 4: Condições de cultivo em meio líquido.....	37
Tabela 5: Iniciadores e programas utilizados para amplificação do DNA fúngico.....	39
Tabela 6: Variáveis e níveis testados no DCCR 2 <sup>3</sup> .....	42
Tabela 7: Origem dos isolados selecionados na triagem inicial em placa.....	45
Tabela 8: Resultado das observações do cultivo dos isolados pré-selecionados nos meios de cultura BDA, Sabouraud e CZAPEK (pH 3, 7 e 10).....	47
Tabela 9: Resultado cultivo em meio líquido da linhagem EARIM3A, após 7 dias.....	48
Tabela 10: Resultado cultivo em meio líquido da linhagem EARIM9A, após 7 dias. ....	48
Tabela 11: Resultado cultivo em meio líquido da linhagem EARJU3E, após 7 dias.....	49
Tabela 12: Resultado cultivo em meio líquido da linhagem ECMP2F3B, após 7 dias.....	50
Tabela 13: Identificação molecular dos isolados EARIM3A e EARIM9A.....	53
Tabela 14: Produção do pigmento extracelular amarelo em g/L após 10 dias (DCCR 2 <sup>3</sup> ).....	72
Tabela 15: Efeitos e Coeficiente de regressão do DCCR 2 <sup>3</sup> para produção de pigmento extracelular.....	73



Tabela 16 - Análise de variância na produção de pigmento extracelular (g/L) em função das variações de pH, rotação e temperatura.....	75
Tabela 17: Produção do pigmento endocelular (amarelo) em g/L (DCCR 2 <sup>3</sup> )...	77
Tabela 18: Efeitos e Coeficiente de regressão do DCCR 2 <sup>3</sup> para produção de pigmento endocelular.....	78
Tabela 19: Variáveis e níveis testados no DCCR 2 <sup>2</sup> .....	79
Tabela 20: Produção do pigmento endocelular (amarelo) em g/L DCCR 2 <sup>2</sup> )...	81
Tabela 21: Efeitos e Coeficiente de regressão do DCCR 2 <sup>2</sup> para produção de pigmento endocelular.....	82
Tabela 22: Parâmetros cinéticos da produção de pigmentos nas diferentes variações de pH, rotação e temperatura testadas no DCCR 2 <sup>3</sup> .....	84
Tabela 23: Variação da Densidade Óptica O.D. em função da alteração do pH.....	100

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	20
2.1. Importância da cor para valorização de produtos.....	20
2.2. Cor e espectro visível.....	21
2.3. Classificação dos agentes colorantes .....	24
2.4. Pigmentos sintéticos x pigmentos naturais .....	26
2.5. Pigmentos naturais.....	28
2.6. Pigmentos fúngicos .....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
3.1 Informações gerais .....	34
3.2 Isolamento e preservação dos microrganismos endofíticos .....	34
3.3 Triagem inicial de produção de pigmentos .....	35
3.4 Pré-seleção de isolados fúngicos produtores de pigmentos .....	35
3.5 Identificação das linhagens fúngicas selecionadas .....	37
3.6 Extração do pigmento .....	39
3.7 Otimização e cinética da produção do pigmento .....	40
3.8 Caracterização química .....	42
3.9 Testes de estabilidade do pigmento .....	43
3.10 Detecção de Micotoxinas .....	44
4. RESULTADOS .....	45
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
6. REFERÊNCIAS .....	108
7. ANEXOS .....	117

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, há um grande interesse no desenvolvimento de processos para a produção de pigmentos de origem natural, visando substituir os corantes artificiais que têm sido largamente utilizados nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas.

Muitos corantes sintéticos não são considerados seguros, causando reações alérgicas e intolerância. Além disso, estes podem ter outros efeitos, como potencial mutagênico e carcinogênico (LOPES, 2011). Corantes sintéticos podem ser precursores de danos ambientais, devido ao escoamento de seus efluentes em rios e lagos, interferindo na penetração da luz solar na água, influenciando a taxa de fotossíntese e interferindo na biota aquática, alterando a solubilidade de compostos gasosos nos corpos d'água (CHANDER et al., 2007; COUTO, 2009).

Pigmentos naturais são menos prejudiciais ao meio ambiente, sendo, na sua maioria biodegradáveis (NAGIA et al., 2007). Na sociedade moderna, os consumidores estão sensibilizados da importância de alimentos saudáveis, e também da preservação do meio ambiente, e há uma tendência ao consumo de produtos considerados seguros e “limpos”. Pigmentos extraídos de fungos são uma alternativa promissora em relação aos corantes obtidos de animais e vegetais, porque não apresentam problemas de sazonalidade e podem ter sua produção otimizada e controlada, estimulando um aumento na produção (MEINICKE, 2008).

Complementarmente, alguns dos pigmentos fúngicos podem ser produzidos a partir de resíduos agroindustriais, o que diminui os custos do processo e, contribui para a preservação do meio ambiente. Fungos, são conhecidos por sintetizar e secretar diversas classes de pigmentos naturais como metabólitos secundários de função conhecida ou desconhecida, que possuem uma extraordinária gama de cores (MALDONADO e IBARRA, 2005). A produção de corantes naturais a partir de fungos pode ser realizada sob condições controladas em biorreatores, assegurando a produção do corante sem a influência da sazonalidade de matérias-primas, e minimizando as contaminações e variações lote-a-lote (MAPARI, et al., 2010). Os principais fatores que influenciam o crescimento e a produção de pigmentos são: a composição do meio de cultivo, temperatura, presença de oxigênio, luminosidade, aeração, pH, fonte de nitrogênio e umidade (RODRIGUEZ, 2009).

Neste trabalho, foram obtidos isolados fúngicos capazes de produzir pigmentos amarelo, vermelho, azul e rosa. Destas linhagens, duas foram selecionadas por apresentarem potencial biotecnológico, devido a produção dos pigmentos e por serem considerados seguros pela indústria, em relação a produção de toxinas. A partir desse trabalho, buscou-se realizar a bioprospecção de pigmentos naturais com características necessárias para sua utilização na indústria: sem toxicidade, estável a alterações de pH e temperatura e alta produtividade com baixo custo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância da cor para valorização de produtos.

As cores estão intimamente ligadas a vários aspectos da nossa vida e são capazes de influenciar as nossas decisões do dia-a-dia. A coloração de um produto tem associação direta com a aparência, o valor final e com a aceitação deste pelo público consumidor. O reconhecimento dessa ferramenta comercial leva à intensificação de estudos sobre a cor e, conseqüentemente, a especialização nos métodos de coloração (CROMEX, 2001).

A aparência, segurança, características sensoriais e aceitabilidade dos alimentos são todas afetadas pela cor (CLYDESDALE, 1993; DOWNHAM e COLLINS, 2000; QUEIJA et al., 2001). Existe uma relação entre certas cores com os alimentos, e isto está relacionado com o nosso desenvolvimento cognitivo, que depende de nossa memória e de nossas experiências, pode – se citar, cores azuis ou verdes sugestionam queijos mofados e cores marrons (escuras) frutas podres ou estragadas (PRADO e GODOY, 2003). Esse mecanismo de advertência, em casos extremos, pode ocasionar aversões. Em alguns estudos, alimentos foram coloridos de forma anormal, como por exemplo, peras vermelhas, bifes azuis e ovos verdes, causando aversões em quase todos os provadores (CLYDESDALE, 1993). A cor pode afetar outras características sensoriais e essa inter-relação pode influenciar no aceite ou não do alimento. De uma forma geral, o verde está associado a frutas pouco maduras e, portanto, mais amargas. Já o sabor salgado, no entanto, não apresenta uma relação direta com as cores. A cor influencia no sabor, na aceitabilidade e, conseqüentemente, na preferência por certos alimentos e bebidas (PRADO e GODOY, 2003), "Nós comemos inevitavelmente com nossos olhos" (STICH et al., 2002). Embora esses efeitos sejam associações inerentes às características psicológicas, estes interferem na escolha e dificultam a quantificação do sabor. Isto é um problema para as indústrias, pois a relação causa-efeito não pode ser ignorada ou minimizada nas formulações de novos alimentos e bebidas que visam suprir nossas necessidades.

Pigmentos são determinantes nas características finais de diversos produtos. Nos cosméticos, o pigmento é responsável pela sensação de beleza do produto. Muitos produtos cosméticos seguem as cores indicadas pela tendência da moda ou adequam a cor para ajustar o produto a sua composição, por exemplo, sabonete de morango com a cor vermelha (VELOSO, 2012).

A indústria de papel nas últimas décadas vem gerando estratégias comerciais que incluem o artifício da cor nos diferentes usos do papel, como em folhas de revistas, banners e catálogos industriais (VELOSO, 2012).

No setor de plásticos, a escolha e desenvolvimento das cores ideais envolve aspectos como estética e propaganda (CROMEX, 2001).

Pigmentos têm seu uso principal no ramo da decoração, sendo empregados para a distribuição de iluminação, para encurtar ou alongar ambientes, esconder ou destacar objetos, elevar ou rebaixar o teto, entre outras aplicações.

## **2.2 Cor e espectro visível**

A luz é um tipo de onda eletromagnética e faz parte do espectro eletromagnético visível ao olho humano, e encontra-se na gama de comprimentos de ondas em torno de 400-700 nm (figura 1). Os seres humanos percebem a luz em comprimentos de ondas específicos, que denominamos como cores (NISHIDA et al., 2016; UFRGS, 2016). A cor é o efeito visual causado pela composição espectral da luz emitida, transmitida ou refletida pelos objetos. Isto é o resultado da modificação física da luz pelos pigmentos, e é observado pelo olho humano e interpretado pelo cérebro (MAPARI, 2009).

Assim, visão de cor é baseada num conjunto de características físicas, químicas, fisiológica, e processos psicológicos. A cor de um determinado objeto depende do tipo de fonte de luz, uma vez que esta irá definir a composição do espectro visível (figura 1), absorvância e/ou reflectância da luz, observado pelo olho humano ou por um instrumento (PINHEIRO, 2016). A mesma cor pode parecer diferente quando visto em duas diferentes fontes de luz, um efeito chamado metamerismo (MAPARI, 2009).

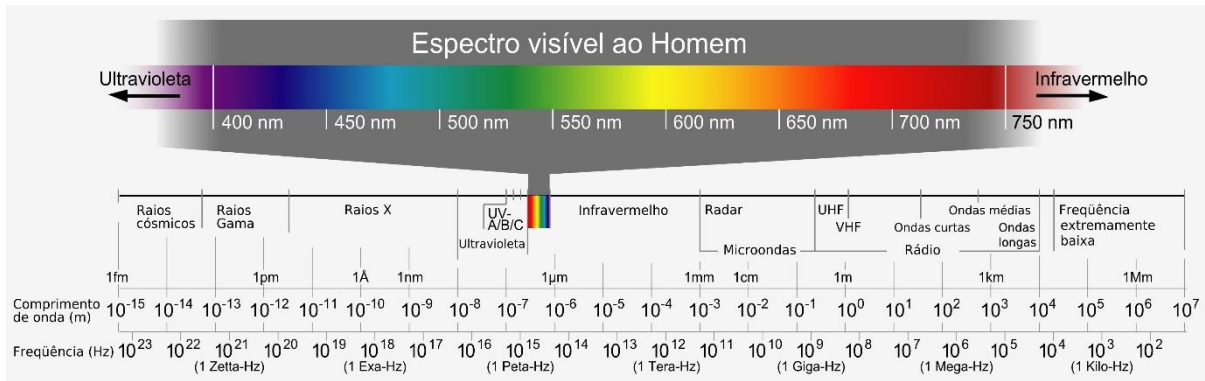


Figura 1: Espectro eletromagnético da luz. Fonte: pt.wikipedia.org

A competência física que permite que a matéria apresente cor é a capacidade de absorver comprimentos de onda de luz visível bem determinados. É importante não confundir a cor absorvida pelas substâncias com a cor refletida por estas, a cor real de uma substância colorida é exatamente aquela que ela não foi capaz de absorver. Por exemplo, um tecido branco não absorve nenhum dos comprimentos de onda da luz visível, refletindo-os, enquanto um tecido preto absorve todos e não reflete nenhum. Esse comportamento está diretamente relacionado às estruturas moleculares dos compostos (PINHEIRO, 2016). Além disso, quando uma fração constante do espectro visível da luz é absorvida, o corpo absorvente aparece cinza. Preto, branco e cinza são chamados cores acromáticas. Cores cromáticas, por outro lado, são geradas quando a matéria absorve especificamente (ou reflete) luz de um determinado comprimento de onda, o que leva a absorção de bandas com valores máximos e mínimos típico no espectro visível. Por exemplo, quando a matéria absorve na parte ultravioleta (comprimento de onda mais curto) do espectro visível (400-430 nm), parte dos comprimentos de onda da luz recebida serão filtrados, enquanto o vermelho e a parte verde (maior comprimento de onda) do espectro visível serão refletidas, o efeito aditivo dos espectros do vermelho e do verde, torna o organismo correspondente amarelo para o observador (MAPARI, 2009). A figura 2 mostra os comprimentos de onda absorvidos e a cor correspondente refletida.



Figura 2: Cores cromáticas que formam a parte visível do espectro da Luz e suas cores complementares vistas pelo olho humano. Fonte: MAPARI, 2009.

As cores podem resultar de fenômenos físicos, como a reflexão ou refração, (como no caso de formação de arco-íris); químicos como os corantes orgânicos e pigmentos; e físico-químicos (como por exemplo nas pedras preciosas) (ZOLLINGER, 2003). A cor de uma molécula biológica é dependente da estrutura, do estado real de energia dos elétrons, do tamanho da molécula, solubilidade e composição elementar. A maioria dos pigmentos biológicos são moléculas grandes, e contém N ou O, muitas vezes, esses elementos combinados (HENRY 1996, citado por MAPARI, 2009).

Elétrons no estado de repouso são o ponto de partida para a liberação dos comprimentos de onda de luz que formarão a cor. Quando uma molécula fica exposta a luz com energia, os elétrons serão excitados. Ao retornarem aos seus estados de repouso, a energia será liberada em uma forma menos energética, que pode ser em forma de calor ou luz, em comprimentos de onda mais curtos. Quase todos os orbitais eletrônicos participam da coloração de compostos, são os orbitais d, p e n. Orbitais excitados são indicadas como d\* e p\*. Transições de d a d\* requerem mais energia do que o previsto pelos comprimentos de onda visíveis, é por isso que estes compostos são vistos como incolor. As transições de p a p\* são menos exigentes em energia do que d a d\*, mas a energia fornecida vai além do comprimento de onda da luz visível. A transição de n para d\* pode aparecer na faixa visível do espectro, como compostos de cor amarela. Mas a transição a partir de n a p\* requer o mínimo de energia, e pode, portanto, ocorrer nos comprimentos de onda



da luz visível, os compostos desta transição aparecerão nas cores vermelha , azul ou verde (MAPARI, 2009).

### **2.3 Classificação dos agentes colorantes**

Pigmentos e corantes são substâncias que quando aplicadas a um material lhe conferem cor. A principal diferença entre pigmentos e corantes é que, quando aplicados, os pigmentos são insolúveis e os corantes são solúveis em meio aquoso (MENDA 2011). Segundo Saron e Felisberti (2006), a diferença básica entre pigmentos e corantes está no tamanho de partícula e na solubilidade no meio em que é inserido. Os autores afirmam ainda que a “solubilidade de um determinado colorante pode ser determinada pela presença de certos grupos químicos na estrutura do composto, os quais podem ocasionar as diferenciações entre pigmentos e corantes”.

Os agentes colorantes podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Naturais quando sintetizados, acumulados ou excretado pelos organismos vivos; eles também incluem corantes feitos pela modificação de materiais a partir de organismos vivos, tais como caramelo, de carbono vegetais, e cobre-clorofilina (MAPARI, 2009); ou a partir de substâncias minerais (VELOSO, 2012). Os corantes sintéticos podem ser artificiais quando não são encontrados em produtos naturais, ou podem ser corantes orgânicos sintéticos idênticos ao natural, quando sua estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural (VELOSO, 2012).

Além da classificação natural ou sintético, com base na química, corantes podem ser divididos em orgânicos ou inorgânicos. Os exemplos destes são os carotenóides simples e dióxido de titânio, respectivamente. A maior parte dos corantes que ocorrem naturalmente e são utilizados, são tipicamente corantes orgânicos. Os corantes orgânicos podem ser classificados como pigmentos e corantes com base em sua solubilidade nos meios; se eles são insolúveis e requerem um fixador para aderir à superfície dos substratos, são pigmentos; os corantes são solúveis no meio a que são adicionados e não necessita de quaisquer fixadores (KAKHIA, 2016; MAPARI, 2009; MENDONÇA, 2011, VELOSO, 2012).

Assim, os carotenóides são corantes em óleo, mas pigmentos na água. No entanto, o termo "pigmento" e "corante" serão usados ao longo da tese para substâncias coradas em geral.

Embora estruturalmente bastante diverso e derivado a partir de uma variedade de fontes, os corantes naturais podem ser agrupados em cinco classes químicas principais: tetrapirrol, tetraterpeno ou caroteno, flavonoide, antraquinona e betalaina, apresentados na tabela 1. Clorofilas, que são pigmentos verdes fotossintéticos presentes em vegetais, por exemplo, pertencem a classe tetrapirrol (MENDONÇA, 2011). Outros membros do aparato fotossintético incluem os carotenóides que são derivados isoprenóides, e proporcionam a cor amarelo-vermelho-alaranjado para muitos frutos. As antocianinas, são da classe dos flavonóides, fornecem a cor vermelho-púrpura a muitas frutas, como morangos, sabugueiro e groselha preta (MAPARI, 2009).

Tabela 1: Principais corantes naturais encontrados na natureza.

CLASSE	CORANTE/PIGMENTO	COR	FONTES DE OBTENÇÃO
Tetrapirrol	Clorofila	Verde	Folhas
	Hemoglobina	Vermelho	Sangue
	Ficocianina	Azul	Cianobactérias
Tetraterpeno	$\beta$ – caroteno	Amarelo	Cenoura
	Astaxantina	Vermelho	Microalgas, salmão,
	Bixina	Vermelho	Semente de urucum
	Licopeno	Vermelho	Tomate, melancia
Flavonoíde	Luteolina	Amarelo	Frutas, flores
	Cianidina	Vermelho	Cereja, morango, açaí
Betalaina	Ácido carmínico	Vermelho	Cochonilha
Antraquinona	Betanina	Vermelho	Beterraba

Fonte: MENDONÇA, 2011 (adaptado).

## 2.4 Pigmentos sintéticos x Pigmentos naturais

As cores presentes na natureza sempre fascinaram e impressionaram os seres humanos (HARI et al, 1994). Este fascínio despertou o interesse para a obtenção de corantes produzidos por organismos vivos, como plantas e animais, antes da invenção dos corantes sintéticos (KAKHIA, 2016). Até meados do século XIX, a obtenção dos corantes ocorria exclusivamente a partir de fontes naturais (GUARATINI e ZANONI, 2000). Porém, devido à dificuldade de extração e alto custo, estes corantes eram reservados para os ricos e utilizados principalmente na tintura de tecidos, o que simbolizava poder (ZARKOGIANNI et al., 2010). Com o surgimento dos corantes sintéticos em 1856, com o pioneiro W. H. Perkin, o qual sintetizou a mauveína ou anilina roxa (PERKIN 1896, citado por MENDONÇA, 2011), o uso dos corantes naturais diminuiu. Nesta época, começou a utilização descontrolada de corantes como aditivos em alimentos populares como ketchup, mostarda e geleias, e se espalhou rapidamente pela Europa e Estados Unidos, porém nunca tinha sido testada a toxicidade e efeitos adversos destes corantes (DOWNHAM e COLLINS, 2000). Com o uso dos corantes sintéticos, diversos problemas relacionados ao seu consumo foram constatados na saúde humana, como intoxicação e morte (PINTEA, 2007).

Devido as vantagens apresentadas pelos corantes sintéticos, como a facilidade de obtenção, o baixo custo, ampla faixa de coloração, a estabilidade a luz, aquecimento e oxidação, melhores propriedades de coloração, com o uso de menores quantidades de corantes, a sua utilização ainda é muito alta nos dias de hoje, uma vez que fornece propriedades adequadas para a aplicação industrial (JACOBSON e WASILESKI, citados por MENDONÇA, 2011)

Atualmente existem órgãos públicos, que estabelecem quais corantes sintéticos são permitidos para uso, após avaliação toxicológica. Porém, cada país adota sua própria regulamentação o que dificulta a extinção total da produção de certos corantes (FRICK, 2003). No Brasil o órgão responsável pela regulamentação do uso de corantes é a ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), e esta permite o uso de 11 corantes sintéticos. Além dos permitidos pelo o comitê científico internacional da JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), que é uma instituição não governamental (PINTEA, 2007).

Depois da revolução industrial, a indústria de alimentos desenvolveu-se rapidamente, surgindo a demanda de uso de corantes sintéticos, que são de fácil obtenção, econômicos, são estáveis e possui um padrão de cor estável. Entretanto, existem problemas em relação à segurança alimentar com o aumento da utilização de corantes sintéticos, o que levou a novas regulamentações determinadas pelas agências reguladoras em vários países, e também a um aumento na demanda por corantes naturais (MAPARI et al., 2010). Atualmente, há um grande interesse mundial no desenvolvimento de processos para a produção de pigmentos de origem natural, visando substituir os corantes artificiais, os quais são amplamente utilizados nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (CHO et al., 2002). Corantes sintéticos são considerados prejudiciais porque foram relatadas reações alérgicas e de intolerância aos mesmos. Além disso, estes podem ter outros efeitos tóxicos como mutagenicidade e potencial carcinogênico (LOPES, 2011). Corantes sintéticos utilizados nas indústrias podem gerar sérios impactos ambientais: os despejos dos efluentes provenientes das indústrias de corantes em rios e lagos interferem na penetração de luz solar na água, influenciando na taxa de fotossíntese, interferindo na biota aquática e alterando a solubilidade dos gases nos corpos d'água (CHANDER et al., 2007; COUTO, 2009).

Pigmentos naturais são menos prejudiciais ao ambiente, sendo mais biodegradáveis e apresentam maior compatibilidade com o meio ambiente (NAGIA et al., 2007). Na sociedade moderna, cada vez mais os consumidores estão sensibilizados da importância da relação entre a dieta e saúde, e também da importância da preservação do meio ambiente, e como resultado, a tendência é para utilização de produtos considerados seguros e "limpos".

Além das vantagens mencionadas para os corantes naturais, outro fator relevante é o valor nutricional que pode ser acompanhado com a adição de alguns corantes (FRANCIS, 1992), como é o caso dos  $\beta$ -carotenos, que apresentam atividade pró vitamina A, fortalecendo o sistema imunológico e diminuindo a suscetibilidade para doenças degenerativas (VALDUGA et al, 2009).

## 2.5 Pigmentos naturais

Devido à avaliação negativa de vários corantes artificiais sintéticos, o processo de desenvolvimento da produção de pigmentos, a partir de fontes naturais tornou-se significativa em todo o mundo. Estes produtos têm sido amplamente utilizados em alimentos, cosméticos, farmacêutica, e processos de fabricação de têxteis (AKILANDESWARI, 2016). Os corantes naturais têm sido utilizados para vários fins, como agentes corantes. Ao longo dos séculos, muitos metabólitos ativos foram descobertos a partir de diversas fontes naturais, tais como plantas, animais, insetos e microorganismos. Entre estas fontes, os microorganismos são o grupo que gera metabólitos que possuem maiores aplicações industriais, eles são quimio-organotrófico, apresentando uma alta taxa de crescimento em um curto ciclo de vida e produzindo grande quantidades de biomassa em um curto espaço de tempo (ROQUE et al., 2006; DUFOSSÉ 2006).

Como grande quantidade de corantes sintéticos têm sido considerados perigosos para a saúde humana, apenas tipos limitados de tais corantes são aceitáveis para serem utilizados em alimentos, e, portanto, existe uma necessidade de desenvolver fontes alternativas (LEE et al., 2001).

Os corantes naturais obtidos de planta e animais possuem algumas desvantagens como: dependência de fatores climáticos e amplo espaço físico, variação significativa da coloração de lote para lote, e limitações na forma de aplicação (MAPARI, 2005). Adicionalmente, a quantidade disponível destes corantes na natureza é insuficiente para suprir as necessidades industriais atuais (ABEROUMAND, 2011), fazendo-se necessário o uso da produção biotecnológica, por exemplo, a qual possibilita a obtenção dos corantes naturais em grande escala. No entanto, a produção biotecnológica de corantes naturais empregando processos fermentativos de microorganismos é a chave para a viabilidade econômica destes corantes, pois apresenta possibilidade de aprimoramento da produção, resultando em altas concentrações de produto em menos tempo. Desta forma, destaca-se também algumas vantagens como: possibilidade de utilização de substratos de baixo custo ou até mesmo resíduos industriais, pequeno espaço para a produção, e são independentes de condições ambientais tais como estação do ano, clima e composição do solo (VALDUGA, 2009).

## 2.6 Pigmentos fúngicos

Existe um grande interesse em pigmentos naturais produzidos a partir de fonte microbiana, pois são uma boa alternativa em comparação com outros corantes sintéticos e naturais disponíveis (SASIDHARAN et al. 2013).

Atualmente, alguns corantes produzidos por microrganismos já são aprovados para consumo e são comercializados, tais como  $\beta$ -caroteno, a Riboflavina e os pigmentos produzidos pelo fungo do gênero *Monascus*. O  $\beta$ -caroteno, o qual pertence à classe dos carotenoides, é obtido por processo de fermentação, principalmente, pelo fungo *Blakeslea trispora*. A riboflavina, também conhecida como vitamina B2, pertence à classe das flavinas e é produzido por diversos microrganismos como: *Clostridium*, *Acetobutylicum*, *Candida flareri*, *Candida guilliermundii*, *Debaryomyces subglobosus*, *Eremothecium ashbyii* e *Ashbya gossypi* (DUFOSSÉ, 2006). Com relação ao fungo *Monascus purpureus*, este produz os corantes: ankaflavina e monascina (amarela), monascorubrina e rubropunctatina (alaranjada) e monascorubramina e rubropunctamina (roxoavermelhado) (MAPARI et al., 2008). Os fungos mostraram potencial na extraordinária gama de cores de pigmentos no vermelho e amarelo. Os espectros utilizando colorimetria quantitativa mostraram que estes pigmentos fúngicos são comparáveis aos corantes alimentares naturais existentes que servem como uma nova fonte de corante alimentar (MAPARI et al. 2006).

Fungos, particularmente ascomycetos, basidiomicetos (cogumelos) e líquenes (associação simbiótica de um fungo com um organismo fotossintético geralmente uma alga verde ou cianobactéria), são conhecidos por produzir extraordinária gama de cores que incluem várias classes químicas de pigmentos (MAPARI, 2009).

Cogumelos e líquenes têm um histórico grande como fontes de pigmentos para a coloração de têxteis. Extratos de micélio de alguns promissores cogumelos, como *Chroogomplius vinicolor* dá as tonalidades de vermelho, *Bankera violascens* dá verdes e *Collybia iocephala* azuis. Eles têm um enorme potencial para corar tecidos de lã e seda (FRANCIS, 1992). No entanto, esses fungos são difíceis de crescer sob condições de laboratório e, por conseguinte, não são adequados para produções industriais em grande escala.

Por outro lado, fungos ascomicetos são mais adequados para a produção biotecnológica, porque eles podem ser cultivados de uma maneira relativamente fácil para dar rendimentos elevados utilizando existente técnicas de cultura. Corantes alimentares de fungos ascomicetos têm sido explorados com poucas tentativas bem sucedidas. Carotenóides, como beta-caroteno e licopeno são conhecidos por serem produzidos por fábricas de células fúngicas. A produção industrial bem sucedida de  $\beta$ -caroteno por *Blakeslea trispora* é o melhor exemplo a ser dado. A primeira empresa a produzir  $\beta$ -caroteno a partir desta fonte fermentativa foi a dos Países baixos. Hoje existem dois outros produtores industriais do  $\beta$ -caroteno fúngico de *B. Trispora*, primeiro na Rússia e na Ucrânia, e depois em Leon (Espanha) (MAPARI, 2009). Outras fontes fúngicas exploradas para a produção de  $\beta$ -caroteno são *Mucor circinelloides*, e *Phycomyces blakesleeanus*. Amplamente conhecida, a vitamina riboflavina (vitamina B2) é um corante alimentar amarelo que é produzido fermentativamente pelo fungos *Eremothecium ashbyii* e *Ashbya gossypi* (ABEROUMAND, 2011). As espécies de fungos do gênero *Monascus* têm sido utilizadas para fazer alimentos orientais, especialmente no sul da China, Japão e Sudeste Ásia, como vinho de arroz vermelho, queijo de soja vermelho e Anka (arroz vermelho). Anka foi tradicionalmente produzida através da inoculação de arroz humedecido com *Monascus*, e o produto continha vários pigmentos ligados a proteínas, peptídeos e aminoácidos. O consumo anual de pigmentos *Monascus* no Japão passou de 100 toneladas em 1981 para 600 toneladas no final dos anos noventa e foi avaliada em US \$ 1,5 milhões. Novas aplicações de alimentos, como a coloração de carnes processadas (salsichas, presunto), produtos marinhos como pasta de peixe, e ketchup foram descritas (ABEROUMAND, 2011).

Os fungos são fonte significativa de pigmentos, uma vez que algumas espécies de fungos são ricos em corantes estáveis (NAGIA e EL-MOHAMEDY 2007). O uso de fungos filamentosos cultivados em diferentes subprodutos agro – industriais mostrou ser uma alternativa para obter pigmentos (LOPES et al., 2013). Os pigmentos comumente produzidos por fungos pertencem aos grupos de policétidos aromáticos tais como melaninas, quinonas (DUFOSSE et al., 2005; CARO et al., 2012), flavinas, ankaflavinas, antraquinonas, naftoquinonas (DUFOSSE, 2006). Devido a uma ampla gama de atividades biológicas de propriedades farmacêuticas, fungos são considerados como tendo intenso benefício para a humanidade (ZHANG et al., 2004). Espécies de fungos produtores de

corantes naturais, fórmula molecular, e sua sugestão de aplicações em diversas áreas industriais estão resumidos e apresentados na tabela 2 e figura 3.

Tabela 2: Espécies fúngicas produtoras de pigmento.

<b>zFungo</b>	<b>Cor</b>	<b>Pigmento</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Referências</b>
<i>Aspergillus niger</i>	Preto	Aspergillina	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>4</sub>	Atividade antimicrobiana	Ray and Eakin, (1975)
<i>Aspergillus niger</i>	Marron	-	-	Atividade antimicrobiana Corante têxtil	Atalla et al. (2011); Aishwarya, (2014)
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	Amarelo	Ácido neoaspergílico	-	Atividade antimicrobiana	Micetich and Macdonald, (1965);
<i>Blakeslea trispora</i>	Amarelo Laranja	β – caroteno	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	Aditivo alimentar Corante de alimentos	Valduga, (2009)
<i>Epicoccum nigrum</i>	Amarelo Laranja Amarelo	Flavipina Oreovactaene Desconhecido	- - -	Corante Antioxidante	Mapari et al., (2005)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Rosa Violeta	Anthraquinona	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Atividade antimicrobiana Corante têxtil	Gessler et al., (2013)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Amarelo	Naphthoquinona	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Atividade antibacteriana	Boonyapranai et al., (2008);
<i>Monascus</i> sp.	Amarelo	Monascina Ankaflavin	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub> C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	Corante de alimentos Produtos farmacêuticos	Juzlova and Martinkova (1996); Mostafa and Abbady (2014);
	Vermelho	Monascorubramina Rubropuntamina	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> O <sub>4</sub>	Atividade antibacteriana Anticancerígeno	Babitha et al. (2008); Moharram et al. (2012); Babula et al. (2009); Yang et al. (2014)
	Laranja	Monascorubrina Rubropuntatin	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub> C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	Antioxidante	
<i>Penicillium herquei</i>	Amarelo	Atronenetina	-	Aditivo de alimentos Antioxidante	Takahashi and Carvalho, (2010)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Vermelho	Anthraquinona	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Anticancerígeno Corante têxtil	Dufosse (2006); Atalla et al., (2011)
<i>Penicillium oxalicum</i> var. <i>armeniaca</i> (Arpink Red™)	Vermelho escuro	-	-	Produzido comercialmente como corante com patente em 120 países.	Sardaryan (2002); Sardaryan et al., (2004)



---

<i>Penicillium Purpurogenum</i>	Laranja	Purpurogenona	$C_{14}H_{12}O_5$	Corante têxtil Corante de alimentos Uso farmacêutico e cosmético	Martinkova et al. (1995); Mapari et al. (2005); Takahashi and Carvalho (2010); Teixeria et al. (2012); Santos-ebinuma et al. (2013);
	Amarelo	Mitorubrina	$C_{21}H_{18}O_8$		
	Vermelho	Mitorubrinol	$C_{21}H_{18}O_8$		
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	Amarelo alaranjado	Pencolide Sclerotiorina	$C_9H_9NO_4$ $C_{21}H_{23}ClO_5$	Atividade antibacteriana Antifúngico Atividade antibacteriana	Chidananda and Sattur (2007); Lucas et al. (2007); Lucas et al. (2010).
		Isochromophilona VI	-		
<i>Trichoderma viride</i>	Amarelo	Viridina	$C_{20}H_{16}O_6$	Corante têxtil Antifúngico Corante de alimentos	Chitale et al., (2012); Neethu et al., (2012); Gupta et al., (2013)
	Verde Marron	- -			
<i>Trichoderma virens</i>	Amarelo	Viridol Virona	$C_{20}H_{18}O_6$ $C_{22}H_{24}O_4$	Corante têxtil Antifúngico	Mukherjee and Kenerley (2010); Sharma et al. (2012); Kamala et al. (2015)

---

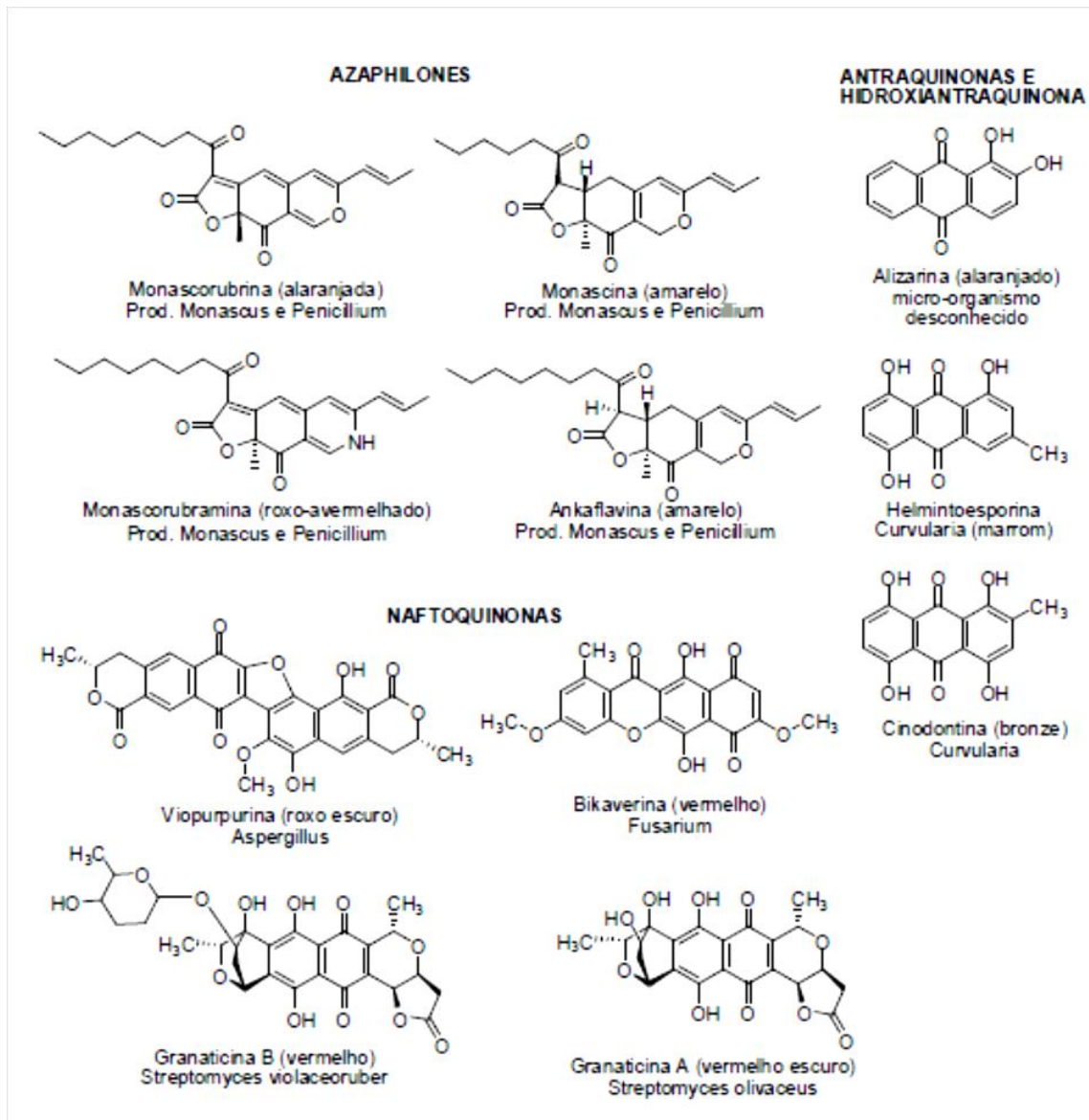


Figura 3: Exemplos de alguns corantes policetídeos, acompanhada da estrutura química, coloração e sua fonte. Fonte: MENDONÇA, 2011.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Informações gerais

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Instituto Federal Baiano do Campus Santa Inês, no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioprospecção, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), e nos Laboratórios de Genética de Microrganismos (LABGEM), Laboratório de Microbiologia, Clínica Fitossanitária, e Laboratório de Fitoquímica na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), *Campus* Cruz das Almas. Os fungos endofíticos, isolados de plantas do Bioma Caatinga do Nordeste brasileiro obtidos neste trabalho, foram depositados na Coleção de Culturas de Endofíticos da UFRB, e utilizados para a triagem inicial de produtores de pigmento.

#### 3.2 Isolamento e preservação dos microrganismos endofíticos

Foram isolados 260 fungos endofíticos de diversas plantas do Bioma Caatinga do Nordeste Brasileiro: *Himatanthus*, *Bowdichia*, *Mimosa tenuiflora* (Jurema), *Ziziphus joazeiro* (Juá), *Astronium fraxinifolium* (Gonçalo – Alves), *Simarouba amara* (Simarouba) e *Comanthera mucugensis* (Sempre-viva). Essas plantas foram coletadas em diversas regiões da Caatinga: Chapada do Araripe – CE ( $-40.03197^{\circ}$   $12' 6''$  Sul,  $40^{\circ}$   $1' 55''$  Oeste), Chapada Diamantina – BA ( $12^{\circ}$   $59' 47''$  Sul,  $41^{\circ}$   $22' 11''$  Oeste), Curaçá – BA ( $8^{\circ}$   $59' 34''$  Sul,  $39^{\circ}$   $53' 60''$  Oeste) e Serra das Confusões – PI ( $9^{\circ}$   $7' 30''$  Sul,  $43^{\circ}$   $48' 11''$  Oeste).

O material botânico coletado foi lavado com água e detergente neutro. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as amostras foram cortadas em fragmentos de 8 a 12 cm e submetidos à desinfestação superficial dos tecidos vegetais, por uma sequência de lavagens sucessivas em álcool 70% (3 minutos), e em hipoclorito 3% (1 minuto), novamente em álcool 70% (1 minuto) e finalmente lavados três vezes em água destilada esterilizada. Os controles foram efetuados com alíquotas de 0,1 mL da última água destilada esterilizada, em três placas de Petri, para cada de meio de cultura ensaiado. Posteriormente, as amostras previamente desinfestadas foram

colocadas sob radiação ultravioleta (U.V. 366 nm), por 10 minutos. Após a assepsia, as amostras foram cortadas em pequenos fragmentos, e foram semeadas em placas de Petri com meio BDA e Agar água (AA) para isolamento de fungos. As culturas foram incubadas em estufa a 28°C e o crescimento dos fungos foi observado a cada 5 dias, por um período de 30 dias. Após o crescimento das colônias dos endofíticos, estas foram transferidas para outras placas com os mesmos meios de cultura e então foram conservadas em óleo mineral, e por meio do método de Castellani, armazenadas a 4°C.

### **3.3 Reativação dos fungos endofíticos e triagem inicial de produção de pigmentos.**

Os isolados foram reativados em meio BDA (batata – dextrose e ágar) e incubados a 30 °C, por 15 dias, aqueles que produziram algum tipo de coloração azul, amarela, laranja, roxa ou vermelha no meio de cultura ou no micélio, foram separados para continuidade dos trabalhos desta tese.

### **3.4 Pré-seleção de isolados fúngicos produtores de pigmentos**

Após triagem inicial, 4 isolados (EARIM3A, EARIM9A, EARJU3E e ECMP2F3B) foram submetidos aos testes preliminares em diversos meios de cultura, e avaliados quanto a produção do pigmento. Foram testados os meios BDA (batata – dextrose – ágar), Czapek-Dox ágar, e Sabouraud, com pH, 3,0, 7,0 e 10, e incubados nas temperaturas 30 °C e 37 °C, durante 20 dias (tabela 3). As análises foram realizadas a cada 48h, de forma qualitativa, observando o crescimento e a produção de pigmentos.

Tabela 3: Composição dos meios de cultura.

Meio de cultura	Composição
CZK	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 g Nitrato de Sódio</li> <li>• 0,5 g Sulfato de Magnésio</li> <li>• 0,5 g Cloreto de Potássio</li> <li>• 0,01 g Sulfato Ferroso</li> <li>• 1 g Fosfato Dipotássico</li> <li>• 30 g Sacarose</li> <li>• 100 mL de água destilada</li> </ul>
BDA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 200g de batata</li> <li>• 20g glicose</li> <li>• 1000 mL água destilada</li> </ul>
SAB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 g peptona</li> <li>• 40 g glicose</li> <li>• 1000 mL água destilada</li> </ul>

Também foram feitos teste para produção do pigmento em meio líquido com esses isolados pré-selecionados. De acordo com os resultados obtidos no teste em placa, o meio batata dextrose foi escolhido para o teste em meio líquido, e a temperatura de 25 °C. Em meio líquido foram testadas as variações de pH (3, 7 e 10), crescimento estacionário e com rotação (100 rpm). Para o inóculo, os isolados foram cultivados em meio BDA, ajustados para a concentração de  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>, com o auxílio de uma câmara de *Neubauer*. Estes inóculos foram adicionados a 70 mL do meio de cultura BD em frascos tipo Erlenmeyrs (500 mL) com o pH ajustado para 6,5. Essas culturas foram incubadas no escuro, a 25 °C, por 10 dias como descrito na tabela 4. As culturas foram analisadas qualitativamente quanto a produção de pigmento, e se este foi liberado no meio de cultura (extracelular), ou se estava associado ao micélio. A partir do cultivo em meio líquido, foi realizado a filtração em papel Whatman™ n° 1, para a separação do micélio. Os filtrados foram analisados em espectrofotômetro, fazendo uma varredura no espectro de luz visível (400 a 700 nm) para determinar o comprimento de onda de maior absorção, e conseqüentemente a cor correspondente, de acordo com metodologia descrita por Mapari et al., (2006). Quando observado o pigmento endocelular, foram adicionados solventes orgânicos ao meio e analisado por espectrofotometria (SP 2000 UV BELL photonics).

Os resultados foram expressos em unidades de absorvância (UA) a um dado comprimento de onda. O meio de cultura autoclavado foi utilizado como branco. Foram selecionados os isolados capazes de produzir pigmento em meio líquido.

Tabela 4: Condições de cultivo em meio líquido.

ENSAIO	PH	ROTAÇÃO (rpm)
1	3	100
2	3	0
3	10	100
4	10	0
5	7	100
6	7	0

### 3.5 Identificação das linhagens fúngicas selecionadas.

As linhagens selecionadas tiveram seu DNA extraído para a identificação molecular. O DNA total dos isolados foi extraído empregando-se o kit para isolamento de DNA microbiano MoBio®. Esses isolados tiveram as regiões ITS,  $\beta$  – tubulina e TEF amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase – PCR. Os iniciadores utilizados para as amplificações dos fragmentos e as condições de amplificação realizadas estão dispostos na tabela 5. Para a realização da PCR em 25  $\mu$ L, utilizou-se 2,5  $\mu$ L de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl); 2,0  $\mu$ L de dNTPs (2,5 mM); 1  $\mu$ L de cada iniciador (10 pmol/ $\mu$ L); 2,0  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,3  $\mu$ L DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L DNA (5 ng/ $\mu$ L) e 14,2  $\mu$ L de água miliQ autoclavada. Os produtos da PCR foram sequenciados através do método de Sanger et al. (1977) utilizando-se dos mesmos iniciadores descritos para a obtenção dos respectivos fragmentos, sendo submetidos à eletroforese em sequenciador do tipo ABI prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem). As reações foram feitas em um volume final de 10  $\mu$ L, contendo 2,5  $\mu$ L de DNA da amostra (5 ng/ $\mu$ L), 0,4  $\mu$ L de primer (10 pM/ $\mu$ L) e 1,0  $\mu$ L de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems), 2,0  $\mu$ l do tampão de seqüenciamento 5X (Applied biosystems)

e 4,1 µL de água ultrapura. As amplificações foram realizadas em termociclador programado para uma desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos de três etapas: desnaturação (96 °C, 10 seg), anelamento (50 °C, 5 seg) e extensão (65 °C, 4 min). Após a amplificação, a precipitação foi realizada com 40 µl de isopropanol 65%, centrifugando a 4.000 rpm por 40 min. Após a precipitação o DNA foi lavado com 200 µl de etanol 60%. O DNA foi ressuspendido em 10 µL de formamida e aquecido a 93 °C por 3 min e resfriado rapidamente. Em seguida, foi submetido à eletroforese em seqüenciador do tipo ABI prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem). A condição de injeção das amostras foi de 2 Kv por 30 seg. A condição de eletroforese foi de 12 Kv por 120 min. A edição e montagem das sequências foram feitas com o programa Sequencher 5.0. Para realizar a identificação molecular, o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) foi utilizado para comparar as sequências obtidas de cada isolado com aquelas encontradas no banco de dados público. As sequencias selecionadas foram alinhadas no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Os modelos evolutivos foram estimados em MrModeltest v.3.7 (HUELSENBECK e RONQUIST, 2001; RONQUIST e HUELSENBECK, 2003) usando o critério de informação Akaike (AIC). A análise foi realizada duas vezes em MrBayes v.3.2 (RONQUIST et al., 2003) usando o algoritmo Monte Carlo de Cadeia de Markov (MCMC) para gerar árvores filogenéticas bayesianas (BPP). As análises foram realizadas com 10.000 gerações. Por meio de análises filogenéticas foi possível identificar dois isolados ao nível de espécie, porém ainda assim foi realizada análise morfológica para corroborar a identificação molecular. As sequencias analisadas foram depositadas no GenBank do Nacional Center for Biotechnology and information – NCBI.

Para o estudo morfológico foram observadas as características macroscópicas e microscópicas dos fungos selecionados de acordo como descrito em Rivera et al., (2012) e Visagie et al., (2014). Os isolados foram cultivados nos meios de cultura CYA (5 °C, 25 °C, e 37 °C) e em MEA 25 °C, após 7 dias tiveram seu diâmetro da colônia medido e foram observadas as cores e características das colônias e do reverso. Para observar e medir estruturas reprodutivas, foram montadas lâminas com lactofenol. As lâminas foram observadas e registradas em microscópio Axio Observer A1 da Zeiss, com filtro DIC, na objetiva de 100x.

Tabela 5: Iniciadores e programas utilizados para amplificação do DNA fúngico.

INICIADOR	MARCADOR GENÉTICO	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIAS	CONDIÇÕES PCR
ITS 1	ITS	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White, T. J., (1990)	Programa segundo White, T. J., (1990)
ITS 4	ITS	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White, T. J., (1990)	
BT2A	B-tubulina	5'-GGT AAC CA A ATC GGT GCT GCT TTC	Glass e Donaldson, (1995)	94 °C 3', 30X (94°C 30", 58°C 30", 72°C 2'), 72°C 5'
BT2B	B-tubulina	5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass e Donaldson, (1995)	
EF-728 M	tef1	5'- CAT YGA GAA GTT CGA GAA GG	Samuels et al., (2011)	Programa touchdown Don et al., (1991)
EF-2	tef1	5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT	Samuels et al., (2011)	

### 3.6 Extração do pigmento

Para realizar a extração do pigmento amarelo, após o cultivo, o meio de cultura líquido excedente foi drenado e reservado. Parte do pigmento produzido fica atrelado ao micélio, outra parte é liberada no meio de cultura aquoso e fica solubilizado, deixando o meio com a cor amarela.

Com intuito de verificar qual o solvente seria mais apropriado para extrair o pigmento foram feitos testes com solventes polares, de polaridade intermediária e apolares: metanol, N-butanol, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, e hexano. Esses solventes foram escolhidos porque são permitidos na União Europeia para utilização em produtos alimentares: água, acetato de etilo, acetona, n-butanol, metanol, etanol e hexano. Para testar a capacidade de o solvente extrair o pigmento presente no meio de cultura líquido foi feita partição ou extração líquido – líquido com os solventes citados, sendo o N-butanol mais eficiente. Para testar a capacidade do solvente para extração do micélio, os solventes testados foram adicionados individualmente ao Erlenmeyer contendo apenas o micélio, até cobrir toda a superfície deste, e após três dias foi retirado e filtrado. Os extratos obtidos foram evaporados em rotaevaporador a vácuo. A eficiência do solvente foi observada qualitativamente por coloração, pela capacidade de arrastar o pigmento,



e também por meio de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) para verificar a riqueza dos extratos.

Para extrair o pigmento do meio líquido, primeiro foi realizada uma filtração em Whatman™ n°1, para retirar resquícios de micélio e esporos. Foi adicionado N-butanol ao filtrado, e em seguida separou-se as fases com o funil de separação. Essa operação foi repetida três vezes, e então o solvente foi evaporado em rotaevaporador a vácuo, restando o extrato seco com o pigmento.

Para extrair o pigmento do micélio, foi adicionado, a este, hexano até cobrir a superfície. O pigmento contido no micélio foi retirado por esse solvente. Esse procedimento foi repetido até o micélio perder a coloração amarela (de duas a quatro vezes). A solução hexânica obtida foi filtrada em Whatman™ n°1 e evaporada em rotaevaporador a vácuo. O extrato seco contendo o pigmento foi pesado.

Os mesmos procedimentos foram realizados para a extração do pigmento vermelho em solução aquosa, já que este é produzido e liberado diretamente no meio, havendo pouco pigmento atrelado ao micélio. Para retirar algum pigmento atrelado ao micélio, foi adicionado a este o solvente metanol, depois foi realizada a metodologia descrita acima para retirar pigmento atrelado ao micélio.

### **3.7 Otimização e cinética da produção do pigmento**

Com o objetivo de determinar uma condição ótima de cultivo, buscando minimizar custos e tempo, e maximizar a produtividade, foi realizado um planejamento experimental completo do tipo Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR, com três fatores ( $2^3$ ): temperatura, pH e rotação. Tal delineamento tem o objetivo de estimar as interações simultâneas entre estes fatores dentro das suas faixas de variação, e determinar o nível de cada fator que maximiza a produção do pigmento (RODRIGUES, 2005). A escolha dessas variáveis foi fundamentada e direcionada pelos experimentos realizados na pré-seleção descritos acima. A matriz experimental realizada testou as variações de pH (2,0 a 10), a agitação (0 a 180 rpm) e a temperatura (20 a 40), com 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios (figura 4). Foi utilizado o meio de cultura líquido batata e dextrose – BD para o cultivo (300 mL de meio em Erlenmeyes de 1000 mL), que foi realizado em incubadoras shaker (SOLAB®). Após

10 dias de cultivo, foi realizada a extração do pigmento do micélio e do meio de cultura como descrito na metodologia de extração a cima. Os extratos obtidos foram secos e pesados como já descrito. A biomassa de cada ensaio foi seca em estufa a 60 °C e pesada em balança de precisão.

Os rendimentos do produto por unidade de biomassa ( $Y_{P/X}$ ), e por unidade de substrato ( $Y_{P/S}$ ) foram calculados como a proporção da quantidade de pigmento produzida ( $P_t - P_0$ ) em um determinado tempo (t) para a biomassa gerada no mesmo tempo ( $X_t - X_0$ ), e para o substrato consumido no mesmo tempo ( $S_t - S_0$ ).

Para o acompanhamento da cinética de produção foi realizada a coleta, em condições de esterilidade, de uma alíquota 1 mL do cultivo de cada ensaio a cada 24h. Essas alíquotas eram centrifugadas a 5.000 rpm por 30 seg para retirar possíveis fragmentos de micélio e tinham a sua O.D. medida em Espectrofotômetro na luz de 400 nm.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para as análises estatísticas. A análise de regressão foi realizada pelo teste t de Student. A Equação do modelo de segunda ordem foi determinada pelo teste. A variância explicada pelo modelo foi dada pelo coeficiente de determinação múltiplo,  $R^2$ . O programa STATISTICA 7.0 da StatSoft Inc. foi usado para essas análises estatísticas e os gráficos gerados.

ENSAIO	X1 (pH)	X2 (rpm)	X3 (T °C)
1	-1 (3,6)	-1 (36)	-1 (24)
2	+1 (8,4)	-1 (36)	-1 (24)
3	-1 (3,6)	+1 (144)	-1 (24)
4	+1 (8,4)	+1 (144)	-1 (24)
5	-1 (3,6)	-1 (36)	+1 (36)
6	+1 (8,4)	-1 (36)	+1 (36)
7	-1 (3,6)	+1 (144)	+1 (36)
8	+1 (8,4)	+1 (144)	+1 (36)
9	-1,68 (2,0)	0 (90)	0 (30)
10	+1,68 (10)	0 (90)	0 (30)

11	0 (6,0)	-1,68 (00)	0 (30)
12	0 (6,0)	+1,68 (180)	0 (30)
13	0 (6,0)	0 (90)	-1,68 (20)
14	0 (6,0)	0 (90)	+1,68 (40)
15	0 (6,0)	0 (90)	0 (30)
16	0 (6,0)	0 (90)	0 (30)
17	0 (6,0)	0 (90)	0 (30)

Figura 4: Matriz planejamento experimental completo do tipo Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR.

Tabela 6: Variáveis e níveis testados no DCCR 2<sup>3</sup>.

Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
pH	2	3,6	6	8,4	10
Rpm	0	36	90	144	180
T °C	20	24	30	36	40

### 3.8 Caracterização química

Para a escolha do melhor solvente extrator para a recuperação do pigmento, estes, foram observados e selecionados pela capacidade de arrastar o pigmento, e também por meio de perfis de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) para verificar a riqueza dos extratos.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H foram obtidos em espectrofotômetro INOVA-500 e Bruker operando a 500 MHz para <sup>1</sup>H. Utilizou-se como solvente o CDCl<sub>3</sub> e C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas do solvente deuterado utilizado clorofórmio. Após análise dos espectros dos diferentes extratos, o hexânico foi escolhido para continuar as análises, por extrair a maior quantidade de pigmento e apresentar maior riqueza de picos no espectro de RMN.

Para conhecer o extrato hexânico e escolher melhor sistema de solvente para o fracionamento posterior foram realizadas cromatografias em camada delgada comparativa (CCDC), onde foram utilizadas como adsorvente sílica gel 60 GF254 da Merk. As placas cromatográficas foram preparadas espalhando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada sobre a placa de vidro. A suspensão de sílica em água destilada foi distribuída manualmente sobre placas de vidro de tamanho 2,5 x 7,0 cm e 5,0 x 20,0 cm. Os cromatogramas em camada delgada foram revelados por irradiação com luz UV de 254 nm e 366nm, bem como vapores de iodo. As placas de Cromatografia em camada delgada preparativa foram reveladas com irradiações de luz UV de 254 e 356 nm.

Para o fracionamento, o extrato hexânico amarelo (18,051 g) foi submetido a uma coluna filtrante empacotada com sílica gel 60 à seco (70-230 mesh) da Merck, utilizando como sistema de eluente hexano/metanol em gradiente crescente de polaridade.

### **3.9 Testes de estabilidade do pigmento**

Para testar a estabilidade da cor do pigmento a alterações de temperatura e exposição à radiação, foram feitos alguns testes a partir dos métodos físicos de controle microbiano utilizados pelas diversas indústrias para esterilizar, desinfestar ou cessar o crescimento de microrganismos que podem causar alterações negativas nos produtos. Nesses testes foram utilizados tanto o filtrado do pigmento (obtido do meio de cultura líquido), como o extrato do pigmento (obtido da extração do micélio), este segundo foi solubilizado em solução alcoólica. Para testar a resistência da cor do pigmento a alterações de temperaturas, alíquotas de 5 mL foram colocadas em tubos de ensaio e levadas ao processo de fervura a 100°C por 30, e 60 minutos. Outros tubos foram levados para autoclave, onde passaram pelo processo de esterilização por calor úmido a 121°C e pressão de 1 atm por 20 minutos. Alíquotas de 10 mL foram congeladas a -20 °C, por 1 mês. As amostras também foram testadas quanto sua exposição a luz UV, ficando expostas por 30 e 60 minutos. Todos os testes foram realizados em triplicata. Após passar por esses métodos, todas as amostras foram analisadas em espectrofotômetro, mediu-se seu valor de

absorbância no comprimento de onda de 400 nm (referente a cor amarela) e 500 nm (referente a cor vermelha). Esses valores obtidos foram comparados com o valor obtido do extrato e do filtrado antes de passar pelos processos.

Para testar a estabilidade da cor as alterações de pH, soluções alcoólicas do pigmento amarelo e soluções aquosas do pigmento vermelho foram distribuídas em tubos de ensaio e tiveram seu pH ajustado para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 com ácido cítrico e hidróxido de sódio. Após ajuste, as amostras foram avaliadas qualitativamente. Em seguida, para a avaliação quantitativa, foram analisadas em espectrofotômetro, obtendo-se seu valor de absorbância no comprimento de onda de 400 nm (referente a cor amarela) e 500 nm (referente a cor vermelha).

### **3.10 Micotoxinas**

Para verificar a presença das toxinas Citrinina, Patulina e Ácido penicílico, o extrato do pigmento amarelo, obtido na melhor condição testada, foi enviado ao Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC, na Universidade Federal de Santa Maria – RS. Aferido pelo controle de qualidade analítica do *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS), da Inglaterra. A análise foi realizada em Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de Massas (LC-MS/MS).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento e triagem inicial em placa

Quatro isolados foram selecionados na triagem qualitativa inicial por produzirem pigmentos em placa. São eles: EARIM3A (amarelo), EARIM9A (vermelho), EARJU3E (rosa), isolados da Chapada do Araripe; e ECMP2F3B (azul) isolado Chapada Diamantina (tabela 7, figura 5).

Tabela 7: Origem dos isolados selecionados na triagem inicial em placa.

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	PLANTA DE ISOLAMENTO	COR DO PIGMENTO	PIGMENTO
EARIM3A	Chapada do Araripe – CE	<i>Himatanthus</i>	Amarelo	Endocelular / Extracelular
EARIM9A	Chapada do Araripe – CE	<i>Himatanthus</i>	Vermelho	Extracelular
ECMP2F3B	Mucugê – BA	<i>Comanthera mucugensis</i>	Azul	Endocelular
EARJU3E	Chapada do Araripe – CE	<i>Mimosa tenuiflora</i>	Rosa	Endocelular

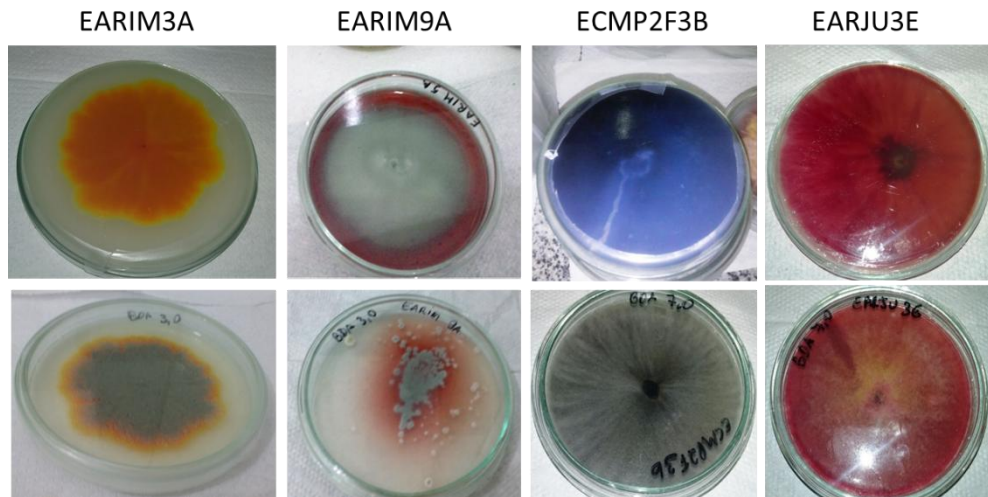


Figura 5: Isolados selecionados na triagem inicial em placa.

## 4.2 Pré-seleção para produção de pigmento em placa e em meio líquido

Com os isolados selecionados, EARIM3A, EARIM9A, EARJU3E, e ECMP2F3B, foi realizada a pré-seleção para a produção de pigmentos de interesse em placa (tabela 8) e em meio líquido (tabelas 9 a 12, figuras 6 a 9).

Na pré-seleção realizada em placa, os isolados EARIM3A e EARIM9A não cresceram a 37 °C.

O isolado EARIM3A na temperatura de 30 °C em 48 horas já apresentava crescimento com exceção no meio Sabouraud pH 3,0, no qual só apresentou crescimento depois de 8 dias, com muito pouco micélio e bastante esporos. A liberação do pigmento com este isolado começou a ocorrer no quarto dia nos meios de cultura BDA pH 3,0, BDA pH 7,0, e CZK, pH 7,0 e 10. No sexto dia no meio CZK pH 3,0. Ocorreu elevada liberação de pigmento no meio e produção no micélio nas placas de BDA pH 3,0 e pH7,0.

Já o EARIM9A na temperatura de 30 °C apresentou crescimento micelial e esporulação em 48 h, com exceção do meio Sabouraud pH 3,0. A produção de pigmento só começou no sexto dia nos meios BDA pH 3,0 e pH 7,0.

O isolado EARJU3E cresceu bem tanto a 37 °C, como em 30 °C. Em ambas temperaturas não houve crescimento no meio Sabouraud com pH 3,0. Nos meios de cultura com pH 3,0, o micélio ficou com uma cor amarela e não houve produção de pigmento. Com a incubação de 30 °C, ocorreu pouca produção de pigmento após 10 dias e nos meios BDA pH 10, e CZK 7,0. À 38 °C ocorreu a produção de pigmento rosa intenso com 48 h nos meios BDA pH 3,0 e BDA pH 7,0.

O isolado ECMP2F3B cresceu em todos os meios de cultura em ambas temperaturas testadas. Em 48 horas, a 30 °C, a maioria dos fungos já apresentavam uma coloração cinza escuro ou preto, com exceção do meio BDA pH 3,0, no qual o fungo apresentou uma cor azul escuro.

O meio de cultura BDA pareceu favorecer a produção de pigmento. Diferente dos outros meios testados, esse, possui além da glicose como fonte de carbono, nutrientes da batata, como o amido, que é um carboidrato complexo, que pode ser responsável por ativar vias metabólicas da produção de pigmento nesse fungo.

Tabela 8: Resultado das observações do cultivo dos isolados pré-selecionados nos meios de cultura BDA, Sabouraud e CZAPEK (pH 3, 7 e 10).

TEMP °C	30°C			37°C			
	ISOLADO / MEIO	BDA	CZK	SAB	BDA	CZKZ	SAB
	<b>EARIM3A</b>	Prod.de pigmento → 96h pH 3* e pH 7*.	Prod.de pigmento → 96h pH 7 e pH 10.	Cresceu, exceto pH 3 (192h). Não produziu pigmento.	Não cresceu.	Não cresceu.	Não cresceu
	<b>EARIM9A</b>	Prod.de pigmento → 96h pH 3,0* e pH 7,0*	Não produziu pigmento.	Não produziu pigmento.	Não cresceu.	Não cresceu.	Não cresceu
	<b>EARJU3E</b>	Prod.de pigmento → 240h pH 10.	Prod.de pigmento → 240 h pH 7.	Cresceu, exceto pH 3,0. Não produziu pigmento.	Prod.de pigmento → 48h pH 3,0*, pH 7,0*.	Não produziu pigmento.	Não produziu pigmento.
	<b>ECMP2F3B</b>	prod. de pigmentos nos pHs 3*, 7*, e 10*.	prod. de pigmentos nos pHs 3*, 7*, e 10*.	prod. de pigmentos nos pHs 3*, 7*, e 10*.	Não produziu pigmento.	Não produziu pigmento.	Não produziu pigmento.

\*placas onde ocorreram bastante liberação de pigmentos.

No cultivo em meio líquido, a linhagem EARIM3A conseguiu crescer e produzir pigmento em quase todas as condições testadas, com exceção no meio de cultura com pH 10 e com rotação. Foi observada tanto a liberação do pigmento amarelo no meio, como sua produção associado ao micélio, com exceção no cultivo com meio de cultura com pH 3,0 e rotação, no qual o pigmento foi liberado somente no meio de cultura (tabela 9, figura 6).

A linhagem EARIM9A produziu o pigmento vermelho liberando-o no meio de cultura, somente nas condições de pH 3,0 e sem rotação (tabela 10, figura 7).

O isolado EARJU3E produziu pigmento associado ao micélio no meio de cultura com pH 10, e sem rotação (tabela 11, figura 8).

A linhagem ECMP2F3B produziu muito pigmento com coloração preta em quase todas as condições de cultivo, com exceção da condição com meio de cultura com pH 3,0 e com rotação (tabela 12, figura 9).



Tabela 9: Resultado do cultivo em meio líquido da linhagem EARIM3A, após 7 dias.

ENSAIO/REPETIÇÃO	1	2	3
E1 (pH 3, 100 rpm)	+ E	+ E	-
E2 (pH 3, 0 rpm)	++ EM	++ EM	++ EM
E3 (pH 10, 100 rpm)	-	-	-
E4 (pH 10, 0 rpm)	++ EM	++ EM	++ EM
E5 (pH 7, 100 rpm)	-	++ EM	++ EM
E6 (pH 7, 0 rpm)	+ EM	+ E	+ EM

+ Moderada produção de pigmento  
 ++ Alta produção de pigmento  
 E Pigmento extracelular  
 M Pigmento associado ao micélio  
 - Ausência da produção de pigmento



Figura 6: Resultado da produção de pigmento em meio líquido pelo isolado EARIM3A. (A) Ensaio 1, pH 3,0 com rotação. (B) Ensaio 2, pH 3,0, cultura estacionária. (C) Ensaio 3, pH 10, com rotação. (D) Ensaio 4, pH 10, cultura estacionária. (E) Ensaio 5, pH 7,0 com rotação. (F) Ensaio 6, pH 7,0, cultura estacionária.

Tabela 10: Resultado do cultivo em meio líquido da linhagem EARIM9A, após 7 dias.

ENSAIO / REPETIÇÃO	1	2	3
E1 (pH 3, 100 rpm)	-	-	-
E2 (pH 3, 0 rpm)	++ EM	++ E	++ E
E3 (pH 10, 100 rpm)	-	-	-
E4 (pH 10, 0 rpm)	-	-	-
E5 (pH 7, 100 rpm)	-	-	-
E6 (pH 7, 0 rpm)	-	-	-

+ Moderada produção de pigmento  
 ++ Alta produção de pigmento  
 E Pigmento extracelular  
 M Pigmento associado ao micélio  
 - Ausência da produção de pigmento

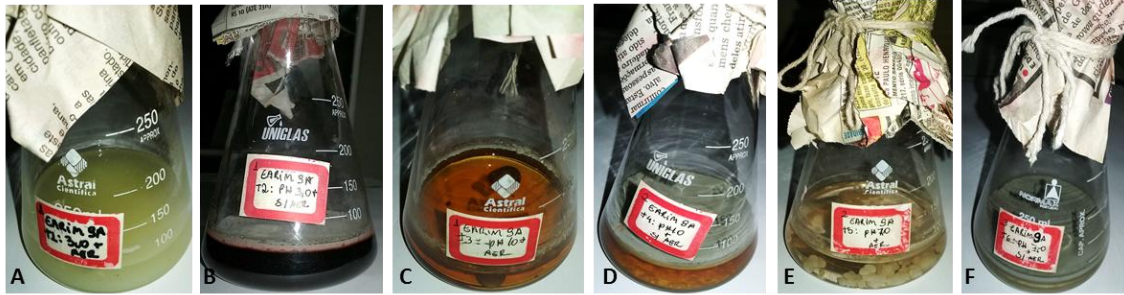


Figura 7: Resultado da produção de pigmento em meio líquido pelo isolado EARIM9A. (A) Ensaio 1, pH 3,0 com rotação. (B) Ensaio 2, pH 3,0, cultura estacionária. (C) Ensaio 3, pH 10, com rotação. (D) Ensaio 4, pH 10, cultura estacionária. (E) Ensaio 5, pH 7,0 com rotação. (F) Ensaio 6, pH 7,0, cultura estacionária.

Tabela 11: Resultado cultivo em meio líquido da linhagem EARJU3E, após 7 dias.

ENSAIO / REPETIÇÃO	1	2	3
E1 (pH 3, 100 rpm)	-	-	-
E2 (pH 3, 0 rpm)	-	-	-
E3 (pH 10, 100 rpm)	-	-	-
E4 (pH 10, 0 rpm)	-	+ M	+ M
E5 (pH 7, 100 rpm)	-	-	-
E6 (pH 7, 0 rpm)	-	-	-

+ Moderada produção de pigmento  
 ++ Alta produção de pigmento  
 E Pigmento extracelular  
 M Pigmento associado ao micélio  
 - Ausência da produção de pigmento



Figura 8: Resultado da produção de pigmento em meio líquido pelo isolado EARJU3E. (A) Ensaio 1, pH 3,0 com rotação. (B) Ensaio 2, pH 3,0, cultura estacionária. (C) Ensaio 3, pH 10, com rotação. (D) Ensaio 4, pH 10, cultura estacionária. (E) Ensaio 5, pH 7,0 com rotação. (F) Ensaio 6, pH 7,0, cultura estacionária.

Tabela 12: Resultado cultivo em meio líquido da linhagem ECMP2F3B, após 7 dias.

ENSAIO / REPETIÇÃO	1	2	3
E1 (pH 3, 100 rpm)	-	-	-
E2 (pH 3, 0 rpm)	++M	++M	+M
E3 (pH 10, 100 rpm)	++M	++M	++M
E4 (pH 10, 0 rpm)	++M	++M	+M
E5 (pH 7, 100 rpm)	-	++M	++M
E6 (pH 7, 0 rpm)	+M	+M	-

+ Moderada produção de pigmento  
 ++ Alta produção de pigmento  
 E Pigmento extracelular  
 M Pigmento associado ao micélio  
 - Ausência da produção de pigmento

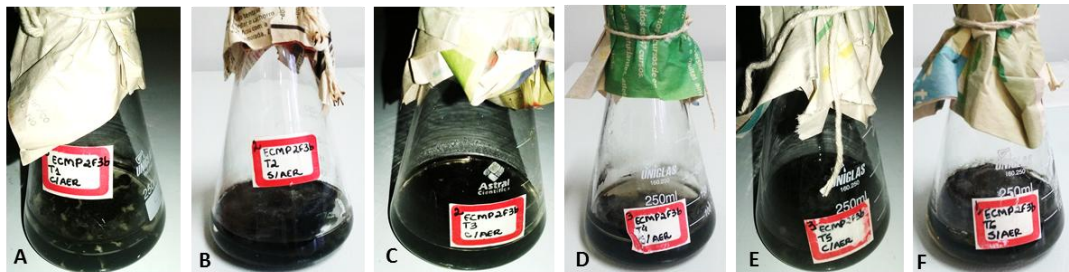


Figura 9: Resultado da produção de pigmento em meio líquido pelo isolado ECMP2F3B. (A) Ensaio 1, pH 3,0 com rotação. (B) Ensaio 2, pH 3,0, cultura estacionária. (C) Ensaio 3, pH 10, com rotação. (D) Ensaio 4, pH 10, sem rotação. (E) Ensaio 5, pH 7,0 com rotação. (F) Ensaio 6, pH 7,0, cultura estacionária.

Após a análise dos isolados quanto ao crescimento e produção do pigmento em meio de cultura líquido e sólido descritos acima, os isolados EARIM3A e EARIM9A foram selecionados para continuar os trabalhos de identificação, otimização da produção, análise química e de estabilidade do pigmento. Esses isolados foram selecionados por vários fatores: produzem pigmentos com cor de interesse para indústria, amarelo e vermelho respectivamente; não cresceram a 37°C, o que, pode indicar, que não são patógenos a humanos; apresentaram boa produção em meio de cultura líquido; são solúveis em meio aquoso; cresce rapidamente; produz e libera o pigmento em poucos dias.

### 4.3 Identificação da cor em espectrofotômetro

Os filtrados dos isolados EARIM3A e EARIM9A, de cores amarelo e vermelho, respectivamente, passaram por uma varredura no espectrofotômetro de 350 nm a 700 nm, espectro equivalente a luz visível, a fim de confirmar a cor dos pigmentos a partir do comprimento de onda com maior absorbância (figura 10). Como pode ser visto na figura 11, o filtrado do EARIM3A obteve maior absorbância no comprimento de onda 380 nm (0,308 UA), que é equivalente a absorção da cor violeta e reflexão da cor amarela, portanto o filtrado do fungo EARIM3A possui a cor amarela. No filtrado do isolado EARIM9A, foi obtida a maior absorbância no comprimento de onda de 500 nm, (0,879 UA), que é equivalente a absorção da cor verde e reflexão da cor vermelha, portanto o filtrado do fungo EARIM9A possui a cor vermelha (figura 12).



Figura 10: Obtenção de filtrado com o pigmento.

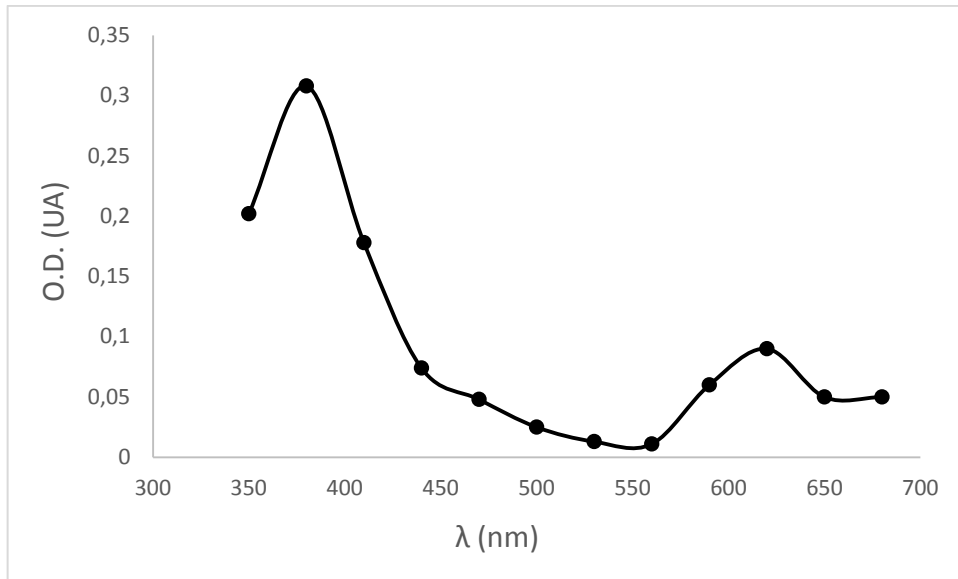


Figura 11: Varredura em espectrofotômetro (350 nm a 700 nm) realizada no filtrado do isolado EARIM3A, para a identificação da cor.

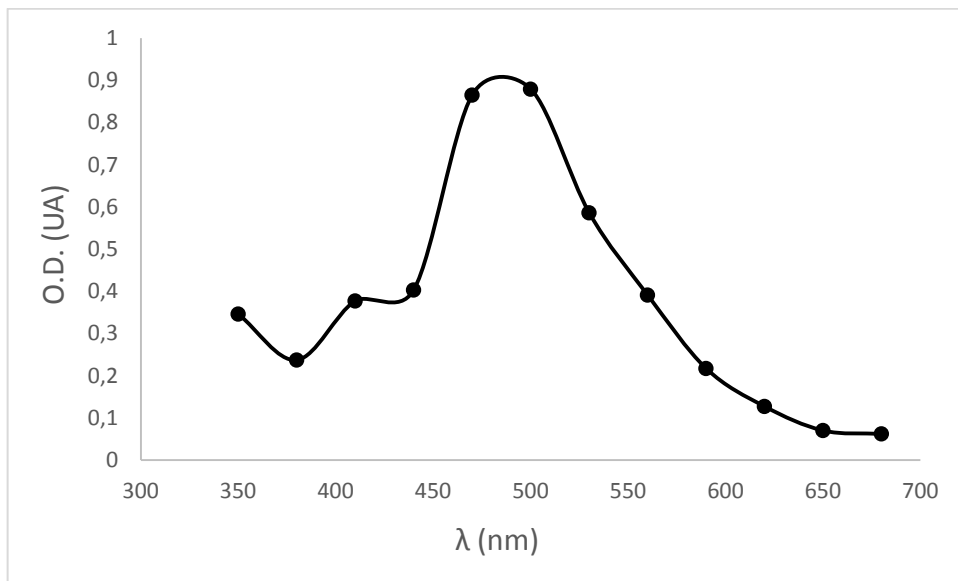


Figura 12: Varredura em espectrofotômetro (350 nm a 700 nm) realizada no filtrado do isolado EARIM9A, para a identificação da cor.

Mesmo que a cor seja um fenômeno perceptivo, a correta descrição da cor é um fator chave tanto para as investigações científicas quanto para as aplicações dos pigmentos em qualquer produto. A investigação qualitativa de espectros físicos nem sempre fornecem a cor correta (ZOLLINGER, 2003). Portanto, uma abordagem quantitativa é necessária para descrever uma cor. Uma das maneiras que a cor pode ser descrita quantitativamente é a análise de soluções coloridas em

espectrofotômetro e sua respectiva absorção máxima de acordo com a lei Lambert-Beer, como realizado nesse trabalho, e também nos trabalhos de Mendonça 2011 e Mapari et al, 2005.

#### 4.4 Identificação das linhagens fúngicas

Após a seleção descrita a cima, os isolados foram identificados a nível de espécie a partir de análise filogenética e morfológica.

O isolado EARIM3A, foi identificado como *Penicillium mallochii* após comparação das sequências com as depositadas no GenBank e análise filogenética como mostrado na tabela 13, figura 13. A partir da comparação das sequencias obtidas com as sequencias depositadas no banco de dados, o isolado EARIM3A, alinhou com as sequencias da espécie *Penicillium mallochii*, sendo o gene  $\beta$ -tubulina considerado informativo para análises taxonômicas para o gênero *Penicillium* por Visagie et al., (2014) e por Rivera et al., (2012), esse fragmento de DNA obteve 99% de identidade e 98% de cobertura.

O isolado EARIM9A, alinhou com as sequencias da espécie *Penicillium cairnsense*, em relação ao gene  $\beta$ -tubulina, esse fragmento de DNA obteve 98% de identidade e 98% de cobertura.

Na árvore filogenética bayesiana o isolado EARIM3A agrupou no mesmo clado da espécie *Penicillium mallochii*, com boa sustentação estatística representada pelo valor de probabilidade a posteriori 1. O isolado EARIM9A agrupou no mesmo clado com *Penicillium cairnsense*, com boa sustentação estatística representada pelo valor de probabilidade a posteriori 1.

Tabela 13: Identificação molecular dos isolados EARIM3A e EARIM9A.

Isolado	Região	Nº bp	Ident.	Cobertura	Espécie	Nº de acesso GenBank
EARIM3A	ITS	570	99%	93%	<i>Penicillium mallochii</i>	KY508651
EARIM3A	TEF	278	99%	98%	<i>Penicillium mallochii</i>	KY508650
EARIM3A	BTUB	456	99%	98%	<i>Penicillium mallochii</i>	KY508648
EARIM9A	ITS	552	99%	98%	<i>Penicillium cairnsense</i>	KY508646
EARIM9A	TEF	277	92%	97%	<i>Penicillium manginii</i>	KY508649
EARIM9A	BTUB	437	98%	98%	<i>Penicillium cairnsense</i>	KY508647



Figura 13: Árvore filogenética Bayesiana construída com alinhamento de 67 sequências da região  $\beta$ -tubulina das espécies de *Penicillium* obtidas no GenBank representativas das seções do gênero, e fragmento do isolado EARIM3A e EARIM9A obtidos neste trabalho. Os valores de probabilidade a posteriori acima de 0,7 são apresentados na árvore. Os isolados são destacados na árvore com uma seta vermelha.

No que tange a análise macromorfológica, o isolado EARIM3A, não cresceu a 37 °C e a 5 °C. Em meio CYA a 25°C, as colônias tiveram diâmetro entre 29 - 35 mm, e aspecto aveludado, com algumas estrias em direção ao centro da colônia. O reverso da colônia possui cor amarelo alaranjado ou branco. Os conídios apresentam uma cor cinza esverdeado. Gotículas de exsudados amarelo - claros produzido de forma moderada (figura 14). No meio de cultura MEA, as colônias tiveram entre 30 - 37 mm, com aspecto plano aveludado. Baixa produção de conídios, que possuem a cor cinza esverdeado. não há exsudatos presentes. O reverso da colônia possui a cor amarelo forte (figura 14). Na análise micromorfológica em objetiva de 100x, observou-se conidióforos monoverticilados, fiálides 8 x 2 µm, com conídios globosos 2 – 3 µm x 2 µm (figura 15).

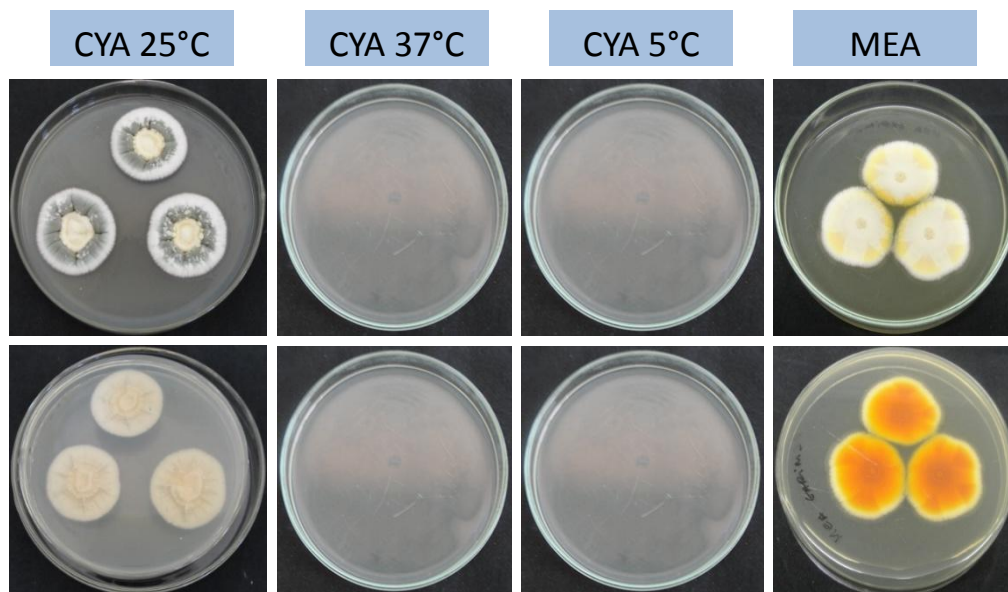


Figura 14: Características culturais do isolado EARIM 3A. Cultivado nos meios de cultura CYA 25 °C, CYA 37 °C, CYA 5 °C e MEA 25 °C por 7 dias, de acordo com os critérios morfológicos de identificação do gênero *Penicillium* definidos por Visagie et al, 2014 e Rivera et al, 2012.



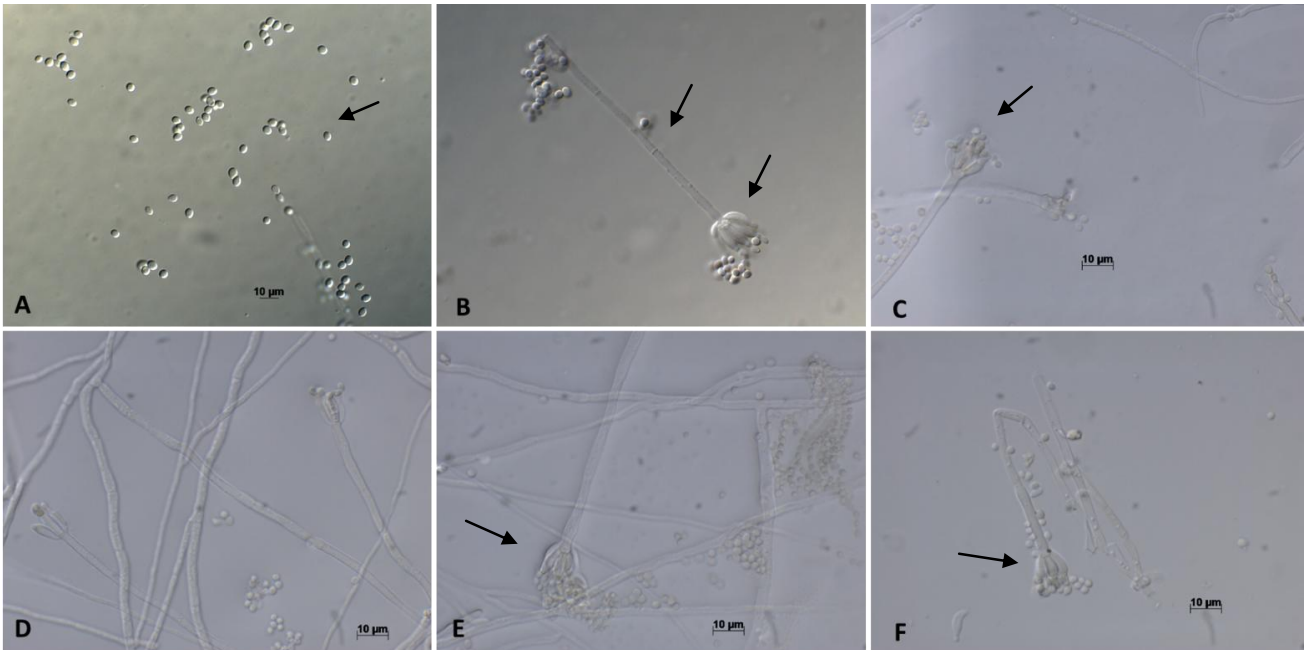


Figura 15: Fotomicrografias do isolado EARIM3A, (cultivado em meio MEA) em objetiva de 100x. (A) Conídios. (B – F) conidióforos, fiáldes e conídios.

A espécie *Penicillium mallochii* foi descrita por Rivera, et al. (2012) (Mycobank MB 563043). Essa espécie foi descoberta em um observatório microbiano no Setor Santa Rosa do Patrimônio Mundial da UNESCO, Área de Conservação Guanacaste, no Noroeste da Costa Rica. Em estudos que buscavam entender o papel ecológico de insetos e micróbios associados em um ecossistema de florestas tropicais. Esse fungo, junto com outros, foram isolados de tripas de lagarta dissecadas, pastilhas fecais e folhas de *Spondias mombin* (Anacardiaceae) em uma tese de mestrado (URB, 2006) e incluiu muitas cepas de *Penicillium*, sendo necessário um estudo taxonômico detalhado para identificar. Para a identificação desta espécie foram feitos estudos morfológicos e molecular. Foram feitas análises filogenéticas com os genes citocromo oxidase 1 (cox1), ITS,  $\beta$ -tubulina (benA), fator de alongamento da tradução 1- $\alpha$  (tef1- $\alpha$ ) e calmodulina (cmd), que levou à descrição da espécie filogeneticamente distinta, *P. Mallochii*, que é muito próxima a *P. sclerotiorum*, fazendo parte da seção Sclerotiora, embora não produza escleródio, característica desse grupo. Além disso, também possui conídios globosos ou sub-globosos, diferente do *P. sclerotiorum* que possui elicoidal (RIVERA et al., 2012; RIVERA et al., 2011).

Em relação ao morfológico, Rivera e colaboradores (2011; 2012) descreveram crescimento em CYA de 29-39 mm, em MEA de 24-35 mm, em relação ao diâmetro, após 7 dias. Identificaram conidióforos monoverticilados, estipes que mediam  $50-380 \times 2-4 \mu\text{m}$ , e uma vesícula terminal  $4-6 \mu\text{m}$  de largura, Fiálides  $7-10 (16) \times 2-3 (4) \mu\text{m}$ . Os conídios (sub) globosos, medindo  $2,5-3,5 \times 2-2,5 \mu\text{m}$ . As Colônias sobre CYA após 7 dias a  $25^\circ\text{C}$  apresentam aspecto aveludado, as vezes com micelio aéreo no centro, moderadamente sulcado, com 4-7 sulcos, muitas vezes enrugado no centro; As cores do conídio variando de azul turquesa a cinza esverdeado; Gotas de exsudato amarelo claro produzido moderadamente em algumas estirpes, ausente em outras; pigmento laranja forte e solúvel presente em algumas estirpes, ausente em outras; 2-3 mm de micélio branco na margem da colônia, margem inteira; Reverso de cor amarelo forte, laranja avermelhado, ou amarelo dourado alaranjado no centro. Colônias em MEA após 7 dias a  $25^\circ\text{C}$  apresentam aspecto aveludado, sem micélio aéreo; conídio cinza esverdeado; sem exudados ou pigmentos solúveis presentes; Reverso cinza esverdeado, ou amarelo avermelhado, amarelo ou amarelo forte, com margem inteira. Conidióforos monoverticilados, estipes septados  $53-380 \times 2-4 \mu\text{m}$ , liso a finamente rugoso, não ramificados, mas algumas estirpes ~ 10% dos conidióforos têm ramos únicos  $15-45 \times 1,5-2 \mu\text{m}$ ; Vesículas  $4-6 \mu\text{m}$  diâmetro; fiálides  $7-10 (-16) \times 2-3 (-4) \mu\text{m}$ , ampuliforme. Conídio globoso a subgloboso, finamente rugoso,  $2,5-3,5 \times 2-2,5 \mu\text{m}$ . A espécie Tipo: Costa Rica, Santa Rosa, Área de Conservação Guanacaste, isolado da folha de *Spondias mombin*, 2003, perna. Joel Díaz, Felipe Chavarría-Díaz e Maria Garcia no. 03- RGTHC-903, isol. M. Urb (Holotype, DAOM 239917, cultura seca em MEA de Blakeslee; Ex-type culture, CCFC 239917). Quanto a etimologia do nome 'mallochii', se referere ao Prof. David Malloch, micologista aposentado da universidade de Toronto.

Quando comparamos a descrição morfológica realizada por Rivera e colaboradores (2011; 2012) com a descrição das características do isolado EARIM3A feita nesse trabalho, pode –se observar que são semelhantes, o que ajuda a corroborar, junto a análise molecular, que o isolado EARIM3A é da espécie *P. mallochii*. Até então a ocorrência dessa espécie foi indicada por Rivera et al. (2011; 2012) na Costa Rica, e por Vega et al. (2015) em solos de uma floresta peruana. Esse trabalho indica uma nova ocorrência, no Brasil, isolado de planta do gênero *Himatanthus* (Apocynaceae) coletada na Chapada do Araripe – CE. Não foram encontrados trabalhos que relatem *P. mallochii* causando problemas a saúde

humana, nem citando a produção de micotoxinas por esta espécie, nem por espécies da seção *Esclerotiora*.

Em relação a análise macromorfológica do isolado EARIM9A, este também não cresceu a 37 °C e a 5 °C. Em meio CYA a 25 °C, as colônias tiveram diâmetro entre 29 - 31 mm, e aspecto aveludado, com algumas estrias em direção ao centro da colônia. O reverso da colônia possui cor amarela no meio CYA. Os conídios apresentam uma cor cinza esverdeado (figura 16). No meio de cultura MEA, as colônias tiveram entre 28 - 30 mm, com aspecto plano aveludado. Produziu conídios, que possuem a cor cinza esverdeado. Não há exsudatos presentes. O reverso da colônia possui cor amarelo claro (figura 16). Na análise micromorfológica em objetiva de 100x, observou-se conidióforos biverticilado. Fiálides 8 x 2 µm, com conídios (sub) globosos, lisos, 2 – 3 µm x 2 – 2,5 µm (figura 17).

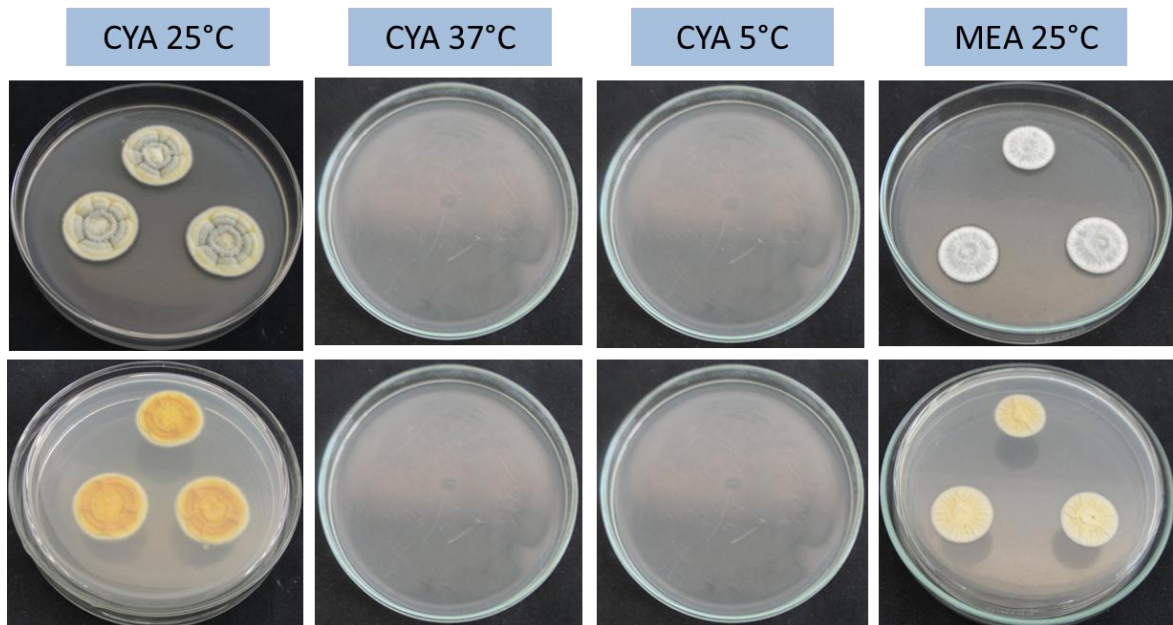


Figura 16: Análise macromorfológica do isolado EARIM 9A. Cultivado nos meios de cultura CYA 25 °C, CYA 37 °C, CYA 5 °C e MEA 25 °C por 7 dias, de acordo com os critérios morfológicos de identificação do gênero *Penicillium* definidos por Visagie et al 2014 e Houbraken et al., 2011.

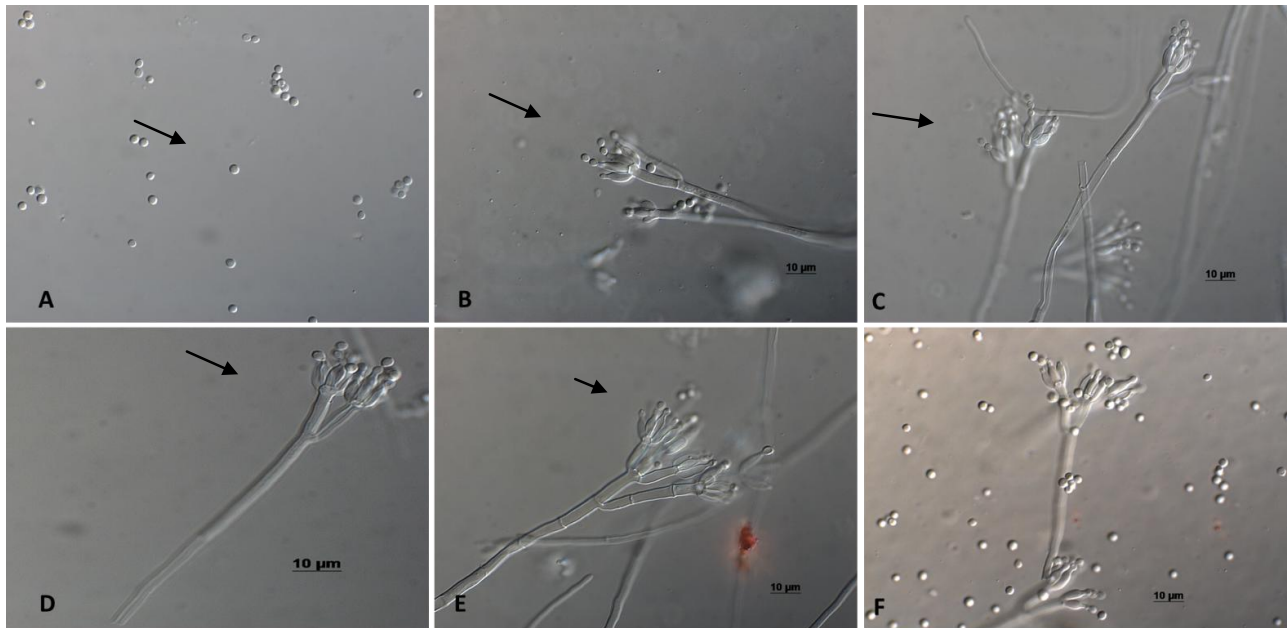


Figura 17: Fotomicrografias do isolado EARIM9A (cultivado em meio MEA) em objetiva de 100x. (A) Conídios (sub) globosos. (B - F) conidióforos biverticilados, fiálides e conídios.

A espécie *Penicillium cairnsense* foi descrita por Houbraken, et al. (2011) (MycoBank MB 563184). Essa espécie foi descoberta próximo a cidade de Cairns na Austrália, isolada do solo. Para a identificação desta espécie foram feitas análises filogenéticas com os genes  $\beta$ -tubulina (*benA*), e calmodulina (*cmd*), sendo incluída na seção Citrina, diferenciando da que é muito próxima *P. querebecense*, (Houbraken, et al., 2011). Em relação ao morfológico, Houbraken e colaboradores (2011) descreveram o diâmetro da colônia em 7 dias: CYA 29-39 mm; CYA30 °C 5-12 mm; CYA37 °C sem crescimento; MEA 28-38 mm; SIM 40-50 mm; e DG18 25-34 mm. Boa esporulação em CYA, micélio com aspecto aveludado, boa esporulação, conídio verde opaco, com o reverso amarelo-laranja ou laranja. Ocorre a produção de pigmentos solúveis de cor vermelha ou avermelhada produzidos pela maioria dos isolados. Boa esporulação em MEA, conídio verde fosco e textura de colônia aveludada. Conidióforos predominantemente biverticilados, os estipes medindo 200-400  $\mu$ m de comprimento, lisos ou ocasionalmente finamente rugosos, 2,0-3,5  $\mu$ m de largura. Fiálides ampuliformes, com curto pescoço, 7 - 9  $\times$  2-3  $\mu$ m. Conídio com

paredes lisas, subgloboso 2,0-3,0 x 2,0-2,5 µm, com uma pequena porção dos conídios maior e com formato globoso, 3,0-3,5 µm (diâmetro).

Os membros da secção Citrina são também conhecidos por produzirem as micotoxinas citrinina e citreoviridina. A toxina nefrotóxica Citrinina é produzida de forma consistente por *P. citrinum*, mas também outras espécies relacionadas incluindo *P. gorlenkoanum*, *P. hetheringtonii*, *P. miczynskii*, *P. chrzaszczii*, *P. manginii* e *P. westlingii*; e Citreoviridina é produzido por *P. miczynskii* e *P. manginii* (Pollock, 1947; Frisvad, 1989; Frisvad & Filtenborg, 1990; Frisvad et al., 2006; Houbraken et al., 2010). Muitos outros metabólitos são relatados como sendo produzidos pelos membros da secção Citrina, entretanto, alguns são erroneamente ligados a certas espécies (Frisvad, 1989; Frisvad & Filtenborg, 1990; Houbraken et al., 2010). O padrão de metabólitos secundários conhecidos de *P. cairnsense* é bastante diverso: benzomalvinas, citreoviridina, fenoenicina, decaturina, Terreína e/ou quinolactacina (Houbraken et al., 2011). Não foi descrita produção de citrina, toxina comumente produzida por algumas espécies da secção Citrinina.

Quando comparamos a descrição morfológica realizada por Houbraken e colaboradores (2011) com a descrição das características do isolado EARIM9A feita nesse trabalho, pode-se observar que são semelhantes, o que ajuda a corroborar, junto a análise molecular, que o isolado EARIM9A pertence ao táxon *P. cairnsense*.

Após realizar a identificação dos isolados EARIM3A, e EARIM9A, como *P. mallochii* e *P. cairnesense* respectivamente, foi possível constatar que ambos são do gênero *Penicillium*, que possui espécies já bastante usadas em processos biotecnológicos. Uma das principais exigências para a seleção de espécies com potencial para produzir pigmentos, é que o fungo produtor não seja patogênico aos seres humanos. A capacidade de fungos filamentosos para coproduzir micotoxinas juntamente com metabólitos industrialmente úteis é muito comum, e constitui um importante obstáculo à sua aprovação pelas autoridades legislativas.

Ambos os isolados que foram estudados (EARIM3A e EARIM9A) não crescem a 37 °C, o que é muito positivo, já que não crescem na temperatura do corpo humano. Além disso, não foram encontrados relatos na literatura dessas espécies relacionadas com doenças. Em relação a produção de micotoxinas, como já mostrado acima, ainda não foram descritas micotoxinas produzidas por *P. mallochii*, e este isolado faz parte da secção Esclerotiora, na qual não tem histórico de espécies que produzam toxinas. Já a espécie *P. cairnesense*, faz parte da secção Citrina, que

possuem várias espécies produtoras de micotoxinas, e além disso já foi relatado a produção da citreoviridina por essa espécie. Trabalhar com uma linhagem que produza micotoxinas é muito mais complicado, mas não é impossível. Precisa-se assegurar condições de cultivo na qual não ocorra, ou, seja produzida de forma mínima esses tipos de substâncias. Existem muitas experiências de produção e utilização de metabólitos de interesse utilizando espécies de fungos já relatadas como produtoras de toxinas. A produção de pigmento vermelho pelo gênero *Monascus* é um exemplo. Esse fungo é tradicionalmente cultivado na China e Japão para obtenção do arroz vermelho, além de seu pigmento ser muito utilizado como corante natural em embutidos e outros alimentos (CARVALHO et al., 2005; HAJJAJ et al., 2000; MAPARI, 2011). Espécies do gênero *Monascus* também são conhecidas por coproduzirem a citrinina junto com os metabólitos de interesse (HAJJAJ et al., 2000; WANG et al., 2005; MAPARI, 2011). Os pigmentos de *Monascus* vêm sendo consumidos ao longo de centenas de anos sem um caso agudo de risco para a saúde, o que significa que não devem ser tóxicos se estiverem em baixa dosagem. Além disso, existem trabalhos que mostram que é possível produzir o pigmento sem a produção de citrinina em condições de cultivo específica (FABRE et al., 1993; CARVALHO et al., 2005)

## **4.5 Extração do pigmento**

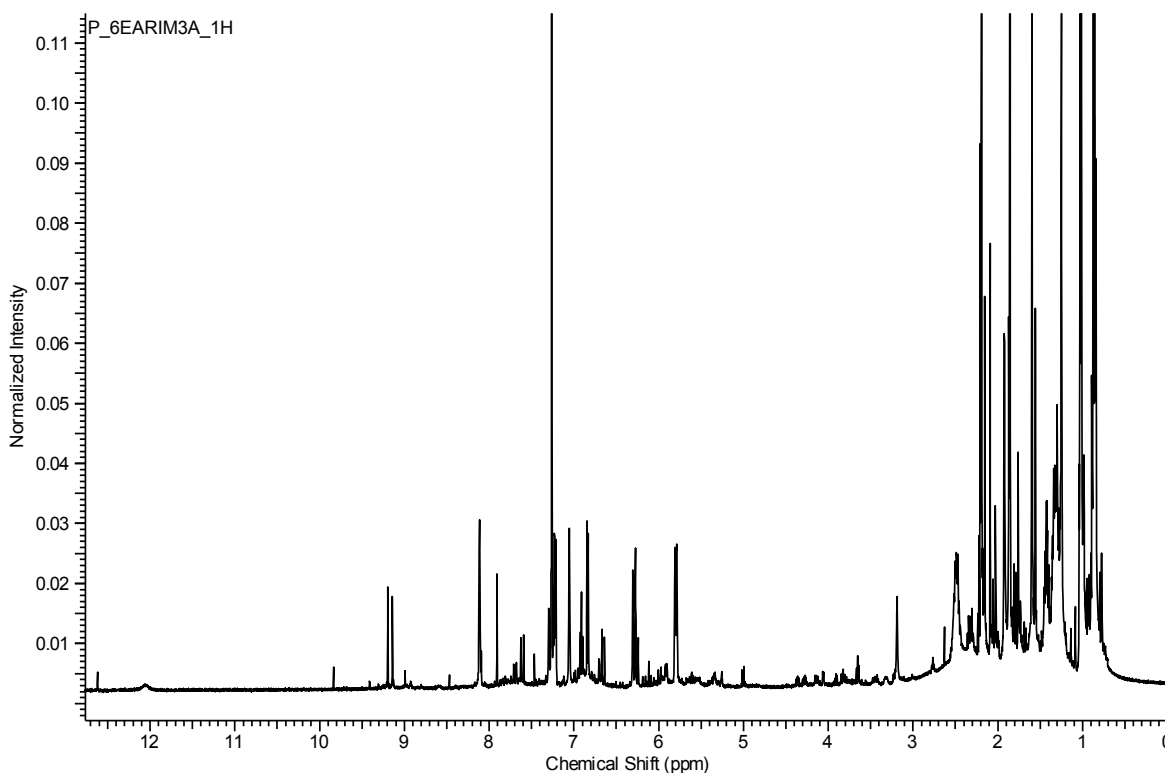
As estratégias para extração de pigmentos foram direcionadas pela utilização de solventes orgânicos para obtenção dos pigmentos extracelulares (aqueles que eram liberados extracelularmente, encontrados dissolvidos no meio de cultivos) e os pigmentos endocelulares (aquele que se encontravam compartimentalizado de alguma forma, na massa micelial da linhagem fúngica produtora), como apresentados na figura 21.

### **4.5.1 Pigmento Amarelo**

O melhor solvente extrator para a recuperação do pigmento a partir da massa micelial (endocelular) com melhor eficiência apresentada pelo hexano, seguido de acetato de etila e clorofórmio. Isto por que, foram observados maior riqueza de sinais e pela intensa coloração amarela no extrato, quando comparado com os outros extratos, figura 18.

O hexano pertence à família dos alcanos acíclicos, é um líquido incolor transparente, menos denso que água e insolúvel em água. Usado como solvente, diluente de tinta e meio de reação química. É muito usado para extrair óleos comestíveis de sementes e vegetais, como um solvente de uso especial, devido a sua característica apolar (National Center for Biotechnology Information, 2017). O pigmento micelial foi caracterizado neste estudo como endocelular, devido ao depósito dos pigmentos produzidos na massa celular. Sabe-se que a liberação dos metabólitos aderidos a massa celular é realizada através do cisalhamento celular, para o rompimento das membrana e paredes celulares e conseqüentemente a liberação dos desejáveis.

Neste estudo, o hexano apresentou foi eficiente para a liberação do pigmento amarelo, possivelmente devido suas características apolares de degradação das membranas devidos ao rompimento das ligações fosfolípídicas, resultando no extravasamento do material extracelular e arraste do pigmento.



**Figura 18:** Perfil químico do espectro de próton, RMN de  $^1\text{H}$  [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ], do extrato hexânico endocelular obtido do isolado EARIM3A.

Os extratos de pigmentos extracelular foram obtidos a partir de caldo de cultura filtrado, submetido ao sistema de partições líquido-líquido com solvente orgânico, esquematizada na figura 21.

O solvente orgânico *n*-butanol foi o único eficiente em extrair o pigmento amarelo da solução aquosa, provavelmente devido a sua polaridade intermediária. Pode-se observar que, a quantidade de pigmento amarelo liberada no meio é muito baixa, quando comparado ao atrelado ao micélio.

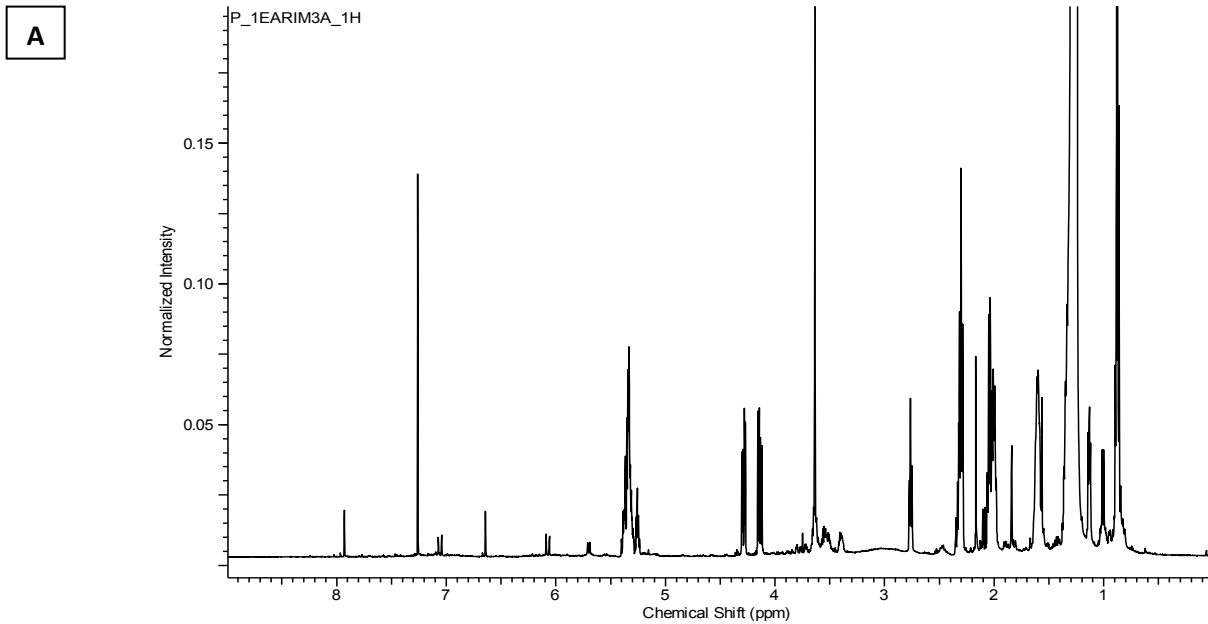
Com intuito de análise comparativa do perfil químico dos extratos obtidos: a partir da extração de pigmentos extracelular, extrato *n*-butanólico (a partir dos filtrados) e pigmentos endocelular, extrato hexânico (a partir da massa celular); os extratos foram submetidos a análise de ressonância magnética celular (RMN  $\text{H}^+$ ) e consequentemente reunir informações úteis para elucidação química da molécula.

Os espectros obtidos revelaram as semelhanças entre os extratos de acordo com a similaridade no perfil dos sinais de próton apresentados na figura 19. Embora, os solventes extratores possuam características quimicamente diferentes, foram eficazes na extração do pigmento de acordo com os experimentos deste estudo, mas em diferentes proporções.



A análise comparativa dos espectros dos extratos (*n*-butanol e hexano) revelou a semelhança de sinais nas seguintes regiões: 7 (7.9, 7.0), região 6 (6.6, 6.1), região 5 (5.4), região 4 (4.4, 4.1), região (2.8), e vários sinais entre (2.5 e 1). Tais dados revelam se tratar do mesmo pigmento amarelo em ambos os extratos, com ressalva que o extrato hexânico possui uma maior intensidade nos sinais, correlacionado a concentração das massas (figura 19).

Devido a condições fisiológicas ou genéticas previamente estabelecidas, após a produção dos pigmentos sua maioria é compartimentalizada e armazenada dentro da célula e apenas uma pequena minoria é liberada ao meio extracelular. Tais característica também, podem estar relacionadas ao nicho ecológico desempenhado pelo isolado.



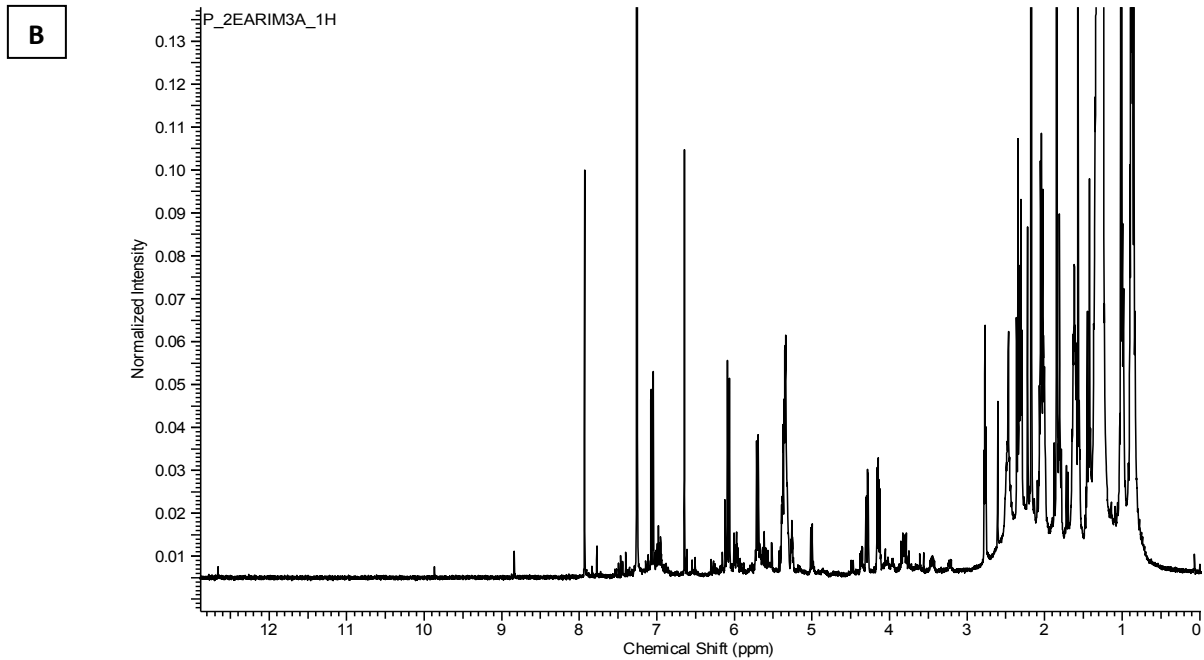


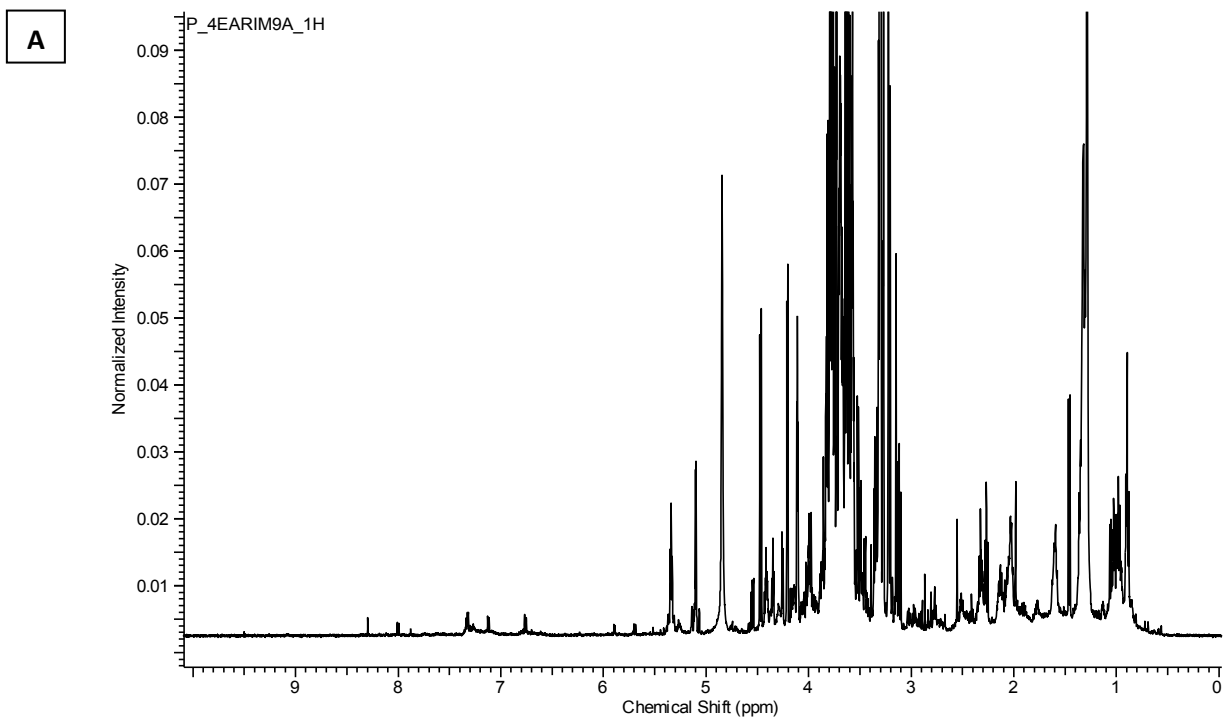
Figura 19: Espectro de próton obtido pela ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do extrato do isolado EARIM3A (pigmento amarelo) [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]. (A) Extrato obtido a partir da extração do pigmento extracelular da fase aquosa com *n*- Butanol. (B) Extrato obtido a partir da extração do pigmento endocelular com hexano.

#### 4.5.2. Pigmento Vermelho

Os extratos dos pigmentos vermelho foram obtidos a partir do isolado EARIM9A. Esta linhagem libera o pigmento diretamente no meio de cultura, o qual solúvel em meio aquoso, com pouco depósito na massa micelial. O solvente metanol foi o melhor extrator para a recuperação do extrato de pigmento a partir da massa micelial, assim como o *n*-butanol foi obtenção dos extratos de pigmentos a partir do meio aquoso (figura 21).

Os espectros de próton obtidos a partir da ressonância magnética nuclear estão apresentados na figura 20. A comparação química revela a riqueza de sinais entre as regiões 1-2 (correspondente aos prótons metílicos), 3-4, predominante dos dois extratos, indicativo do mesmo composto pigmentado obtidos em ambos processos extratores, com diferentes níveis de eficiência, devido a variação da intensidade de sinais, diretamente relacionado a concentração massa/massa de cada extrato. Os extratos obtidos a partir do filtrado apresentou maior riqueza de sinais figura 20(A), com particularidades para os sinais 5.35 e 4.45 não observado no espectro da figura 20(B), obtido a partir da massa micelial. Sinais específicos

para os extratos do pigmento micelial foram identificados no intervalo 6.5. Tais sinais, podem não estar correlacionados ao pigmento vermelho, uma vez que a coloração vermelha está presente em ambos os extratos, entretanto, mas os dados aqui apresentado não são conclusivos e há necessidade de complementação de dados espectrométricos. O perfil químico desses apresentam diferenças, mas, a extração com *n*-butanol pareceu ser mais eficiente devido a maior concentração do pigmento está no meio aquoso, refletido na maior riqueza e intensidade dos sinais verificado no espectro.



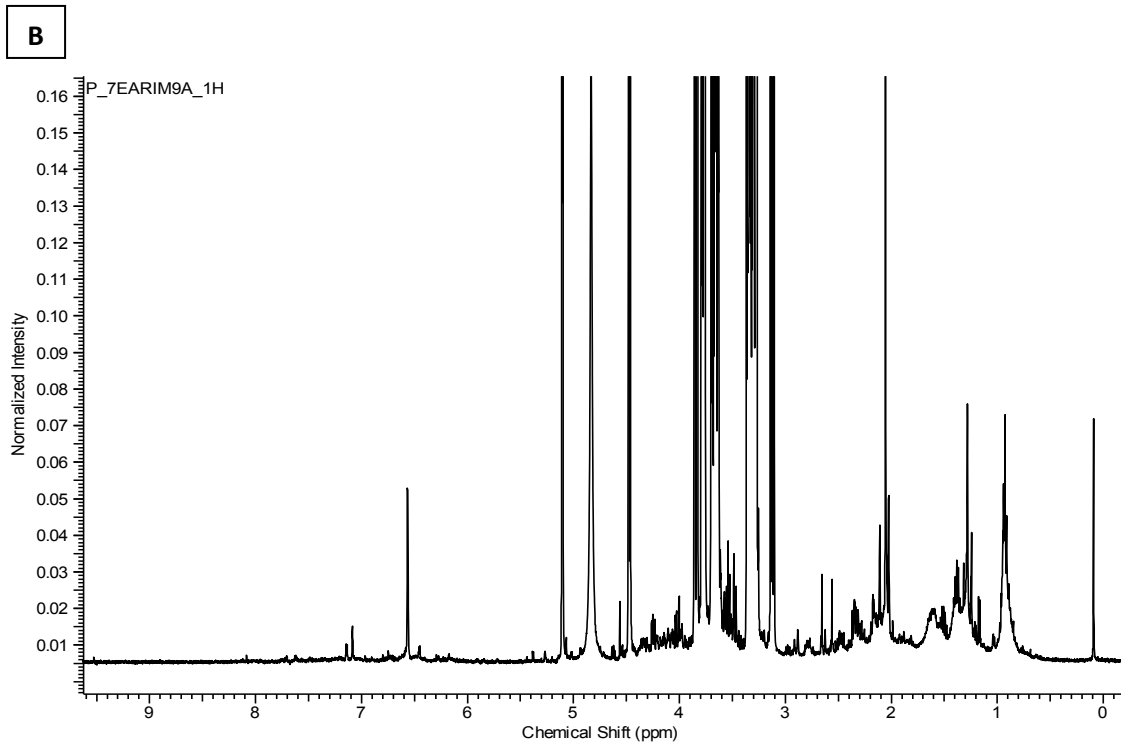


Figura 20: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de do extrato do isolado EARIM9A (pigmento vermelho) [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ]. (A) Espectro obtido a partir da extração do pigmento do micélio com metanol. (B) Extrato obtido a partir da extração do pigmento da fase aquosa com *n*-butanol.

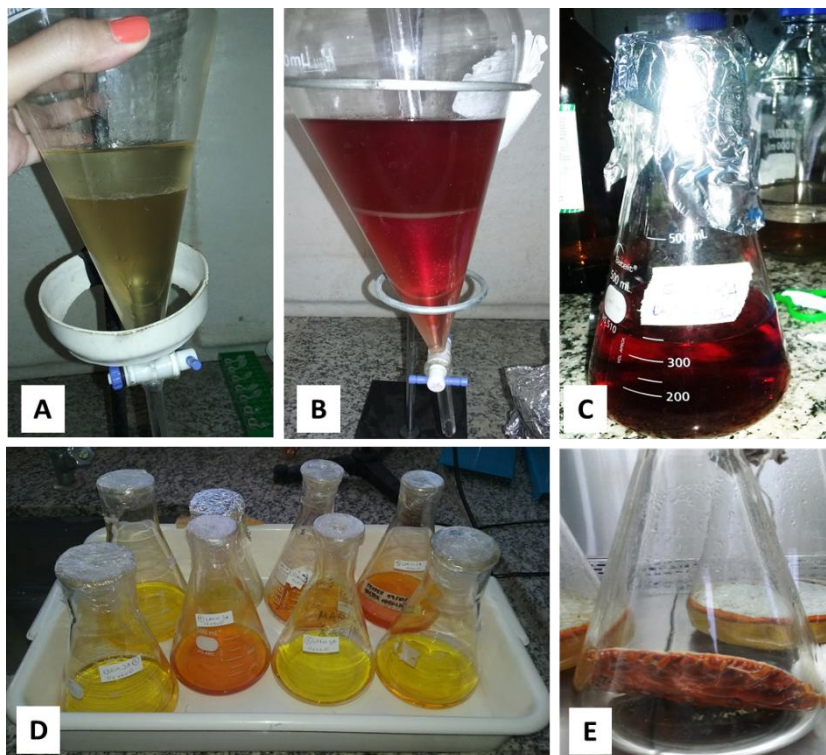


Figura 21: Obtenção de extratos com o pigmento. (A) Partição da fase aquosa com o pigmento amarelo utilizando o solvente *N* – Butanol. (B) Partição da fase aquosa com o pigmento vermelho utilizando o solvente *N* – Butanol. (C) Solução de *N*-butanol com o pigmento. (D) Extratos hexânico e de acetato de etila obtidos a partir da extração do pigmento amarelo do micélio. (E) Micélio com o pigmento amarelo pronto para a extração.

#### 4.6 Otimização da produção utilizando planejamento experimental (DCCR 2<sup>3</sup>) e cinética de produção do pigmento amarelo.

O isolado EARIM9A, identificado como *P. cairnesense*, não produziu pigmento em nenhum dos ensaios testados. Aparentemente este isolado parece produzir o pigmento vermelho em condições específicas. Neste trabalho, conseguimos induzir a produção do pigmento vermelho desse isolado em meio de cultura Batata – Dextrose (BD), pH 3,0, na faixa de temperatura de 25 °C a 30 °C, em cultura estacionária, essa condição foi utilizada nos ensaios realizados na pré-seleção de fungos produtores de pigmento descrito acima (item 4.2).

O Isolado EARIM3A, identificado como *P. mallochii*, produziu o pigmento amarelo em diferentes condições de cultivo: na faixa de pH (2,0 a 8,4); na temperatura de 24 °C a 30 °C; e foi capaz de produzir de forma estacionária, ou com rotação variando de 36 a 144 rpm. O pigmento foi produzido tanto endocelular, quanto liberado no meio de cultura, de forma que foi analisado separadamente a produção extracelular e a produção no micélio. A quantidade de extrato de pigmento endocelular foi elevada em quase todos os ensaios em relação ao pigmento extracelular como mostra a figura 22.

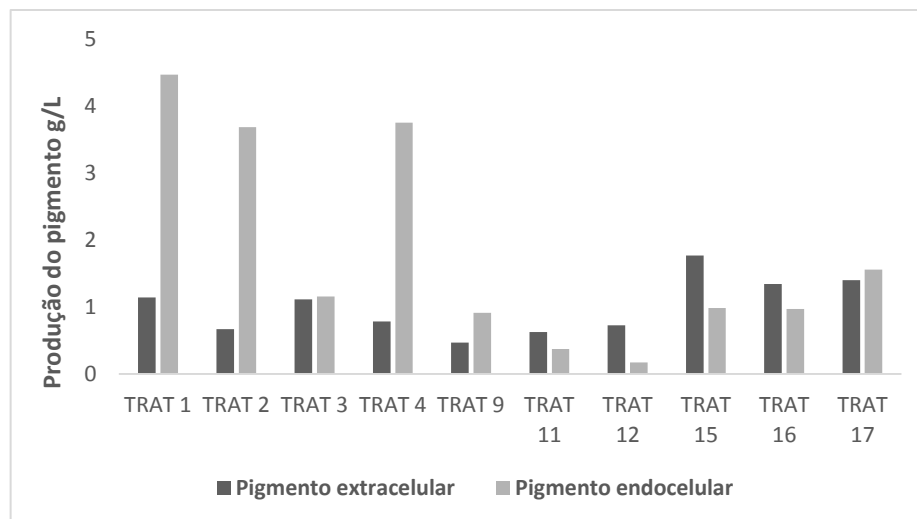


Figura 22: Resultado do planejamento experimental DCCR completo, comparando produção de pigmento do micélio com o pigmento extracelular. Os ensaios 5, 6, 7, 8, 10, 13 e 14 não foram apresentados pois não ocorreu crescimento/produção.

Nos ensaios 5, 6, 7, 8, 14, não houve crescimento da linhagem fúngica. O fungo não cresceu nesses ensaios devido as altas temperaturas de 36°C e 40°C. A espécie *P. mallochii* não cresce em temperaturas acima de 35 °C. No ensaio 13, caracterizado pela temperatura de 20 °C, a linhagem fúngica também não cresceu. No ensaio 10 o fungo também não cresceu por conta do pH bastante alcalino (pH 10), que pode ter inibido o crescimento.

A produção de biomassa muitas vezes está associada à do metabólito de interesse, de forma diretamente proporcional, quanto mais biomassa, mais produto. Esse não foi o caso para a produção de pigmento amarelo por *P. mallochii*, como é mostrado nas figuras 23 e 24. A produção de biomassa, medida em peso seco do micélio (g), parece não ter relação com a quantidade de pigmento produzida. Mesmo os ensaios em que o isolado apresentou baixa produção de pigmento, a quantidade de biomassa produzida foi similar ou até maior do que os ensaios que tiveram alta produção. Isto indica que as variações nas condições de cultivo podem estar interferindo diretamente na via metabólica da produção do metabólito secundário, sem interferir nos processos de crescimento e reprodução celular, sendo essas vias independentes.

No gráfico da figura 23, por exemplo, referente a produção de pigmento extracelular, pode -se observar que a maior produção de biomassa foi no ensaio 12 que tem as condições de cultivo ajustadas para pH 6, 180 rpm e 30°C. Essa condição foi favorável ao crescimento do fungo, pH levemente ácido que favorece crescimento de fungos filamentosos no geral, temperatura semelhante ao ambiente onde o fungo foi isolado e rotação que possibilita oxigenação. Entretanto, essa condição de cultivo não foi tão favorável a produção do pigmento extracelular que foi de 0,728 g.L<sup>-1</sup>, muito abaixo do ensaio que apresentou maior produção (15) 1,771 g.L<sup>-1</sup> de pigmento.

No gráfico da figura 24 que compara a produção de pigmento do micélio com a biomassa, pode-se notar que o ensaio com maior produção foi o ensaio 1 com 4,471 g.L<sup>-1</sup> e não foi o que teve maior crescimento micelial. Mendez et al. (2011) estudaram a produção de pigmentos vermelhos por isolados da espécie *Penicillium purpurogenum* em diferentes condições de cultivo e também não encontraram associação entre a biomassa e a produção do pigmento. Mapari et al. (2008) avaliaram o crescimento, morfologia e produção de pigmento amarelo em *Epicoccum nigrum* e demonstraram também que não existe relação direta entre o

crescimento máximo e produção de pigmentos, em vez disso, a produção está relacionada com os fatores de cultivo assim como foi visto nesse trabalho. Os dados relatados por Cho et al. (2002) não concordam com os nossos resultados. Eles testaram um isolado de *Paecilomyces sinclairii* em cultura submersa e verificou que o crescimento do fungo e produção de pigmentos foram favorecidos nas mesmas condições.

A produção de pigmentos pode ter sido fortemente influenciada pela temperatura e pH juntos, ou separadamente, como mecanismo provavelmente relacionados a fatores genéticos, controle metabólico ou um mecanismo de defesa ligados ao estresse metabólico (VÁZQUEZ-DUHALT, 2002).

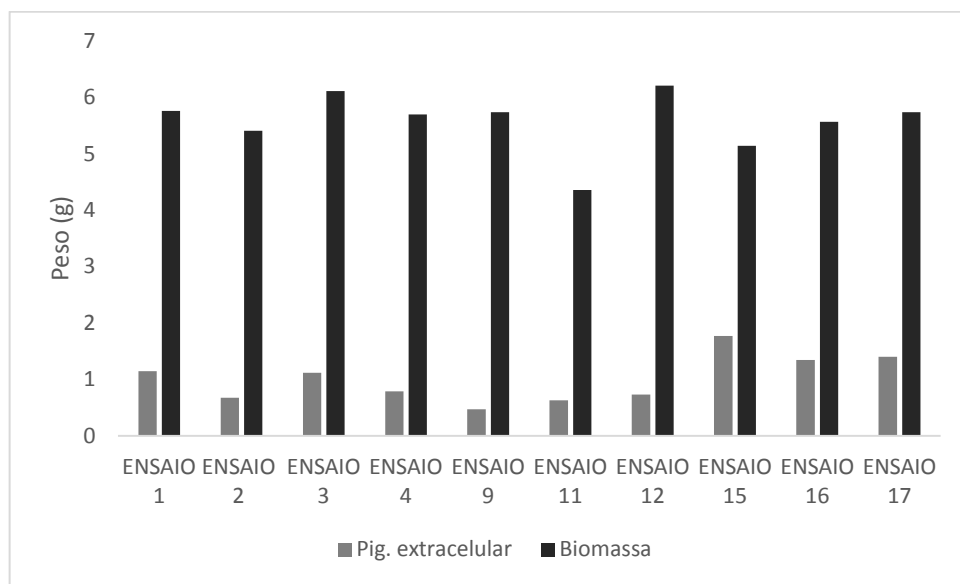


Figura 23: Comparação entre a biomassa (peso seco micélio g.L<sup>-1</sup>) e a produção do pigmento amarelo extracelular de *P. mallochii*.

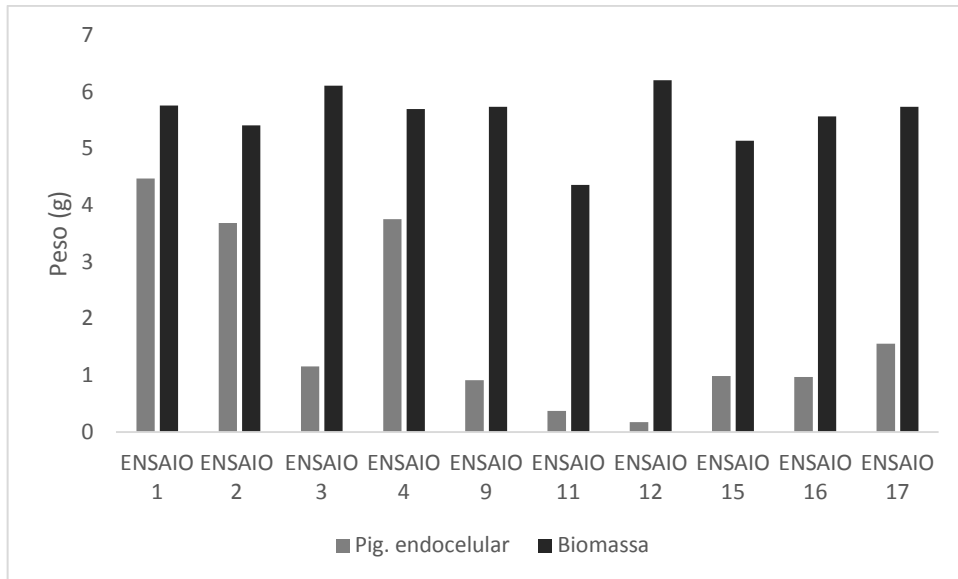


Figura 24: Comparação entre a biomassa (peso seco micélio  $\text{g.L}^{-1}$ ) e a produção do pigmento amarelo do micélio de *P. mallochii*.

Em relação a produção do pigmento amarelo extracelular, o ensaio 15, (pH 6,0, 90 rpm e 30 °C) foi o que obteve a melhor produção do pigmento extracelular,  $1,771 \text{ g.L}^{-1}$ , seguido dos ensaios 17 ( $1,4 \text{ g.L}^{-1}$ ) e 16 ( $1,342 \text{ g.L}^{-1}$ ), todos do ponto central. Já o ensaio 9 (pH 2, 90 rpm e 30°C), foi o de menor produção desse (tabela 14).



Tabela 14: Produção do pigmento extracelular amarelo em g.L<sup>-1</sup> após 10 dias (DCCR 2<sup>3</sup>).

<b>Ensaio</b>	<b>PH</b>	<b>RPM</b>	<b>T °C</b>	<b>Pigmento extracelular (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Peso seco micélio (g.L<sup>-1</sup>)</b>
ENSAIO 1	3,6	36	24	1,14	5,76
ENSAIO 2	8,4	36	24	0,67	6,41
ENSAIO 3	3,6	144	24	1,11	6,11
ENSAIO 4	8,4	144	24	0,78	5,70
ENSAIO 5	3,6	36	36	0	0
ENSAIO 6	8,4	36	36	0	0
ENSAIO 7	3,6	144	36	0	0
ENSAIO 8	8,4	144	36	0	0
ENSAIO 9	2,0	90	30	0,47	5,74
ENSAIO 10	10	90	30	0	0
ENSAIO 11	6,0	0	30	0,63	4,36
ENSAIO 12	6,0	180	30	0,73	6,21
ENSAIO 13	6,0	90	20	0	0
ENSAIO 14	6,0	90	40	0	0
ENSAIO 15	6,0	90	30	1,77	5,14
ENSAIO 16	6,0	90	30	1,34	5,57
ENSAIO 17	6,0	90	30	1,4	5,74

Tabela 15: Efeitos e Coeficiente de regressão do DCCR 2<sup>3</sup> para produção de pigmento extracelular.

Fatores	Efeitos	Coef. de regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor	Estimativas por intervalo (95 %)	
						Limite Inferior	Limite Superior
Média	1,49	1,49	0,18	8,09	0,000084	1,05	1,92
pH (L)	-0,14	-0,07	0,08	-0,84	0,425570	-0,27	0,13
pH (Q)	-0,88	-0,44	0,09	-4,66	<b>0,002293</b>	-0,66	-0,21
RPM (L)	0,08	0,04	0,08	0,46	0,655840	-0,16	0,24
RPM (Q)	-0,60	-0,30	0,09	-3,18	<b>0,015452</b>	-0,52	-0,07
T °C (L)	-0,40	-0,20	0,08	-2,33	0,052201	-0,40	0,002
T °C (Q)	-0,96	-0,48	0,09	-5,09	<b>0,001411</b>	-0,70	-0,25
pH x RPM (L)	-0,18	-0,09	0,11	-0,80	0,446595	-0,35	0,17
pH x T °C (L)	0,15	0,07	0,11	0,67	0,518461	-0,19	0,34
RPM x T °C	-0,08	-0,04	0,11	-0,39	0,704431	-0,31	0,22

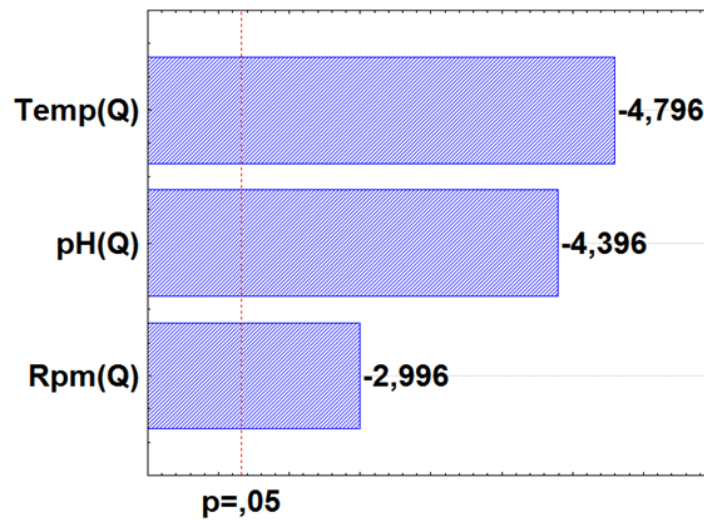


Figura 25: Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável significativa em função da temperatura, pH e rotação (Pigmento extracelular).

Entre as variáveis de cultivo testadas no DCCR 2<sup>3</sup> para a produção de pigmento extracelular foi observado que a Temp (Q), o pH (Q) e o RPM (Q) apresentaram efeito significativo no intervalo de confiança de 95% (p-value < 0,05),

todas elas influenciam no aumento da produção do pigmento extracelular. Esse resultado é demonstrado pelo diagrama de Pareto (figura 25) e a tabela de regressão (tabela 15). Os efeitos Lineares de todas as variáveis não foram significativos ( $p\text{-value} > 0,05$ ). O efeito das interações também não foi significativo ( $p\text{-value} > 0,05$ ), isto indica que o aumento simultâneo da temperatura, pH e rotação no meio, reflete uma redução na produção do pigmento. Vale ressaltar que, o programa Statistica gera um modelo ajustado aos dados experimentais. E os termos lineares e quadráticos se referem aos termos do modelo gerado.

A temperatura de 30°C (ponto central) pareceu favorecer a produção do pigmento extracelular, pois nos ensaios (15, 16 e 17) com essa temperatura a produção do pigmento foi maior.

O modelo de regressão obtido para prever a produção de pigmento dentro da região avaliada, bem como o efeito das variáveis independentes (pH, rpm e Temperatura) dos ensaios de produção. Está expresso sob a forma da Equação 1:

$$y = 1,49 - 0,44x_1^2 - 0,30x_2^2 - 0,48x_3^2 \quad (1)$$

Onde:  $y$  = produção de pigmento extracelular

$x_1$  = pH

$x_2$  = rpm

$x_3$  = Temperatura °C

Adicionalmente a análise deste resultado o modelo apresentou um coeficiente de determinação aceitável  $R^2 = 0,72$ , após a análise de regressão, demonstrando proximidade entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelos resultados de produção de pigmentos obtidos na Equação 1, pois quanto mais próximo de um for este valor, melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais.

A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão obtido para a produção de pigmento extracelular em função do pH, rotação e temperatura, é apresentada na Tabela 16. De acordo com a Tabela da ANOVA, o valor de  $F$  calculado para o modelo de produção do pigmento extracelular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foi igual a 10,75, ou seja, maior que o valor de  $F$  tabelado (3, 41) no intervalo de 95% de

confiança. Assim, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com teste  $F$ .

Tabela 16 - Análise de variância na produção de pigmento extracelular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) em função das variações de pH, rotação e temperatura.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valor de $F$
Regressão	3,87	3	1,29	10,75
Residual	1,5	13	0,12	
Total	5,37	16		
$F$ tabelado (95%)				$F = 3,41$

De acordo com o planejamento composto central rotacional obteve-se uma faixa ótima dentro do desenho experimental avaliado, ou seja, uma produção de pigmento extracelular em torno de  $1,77 \text{ g.L}^{-1}$  quando foi utilizado o pH 6,0, rotação 90 rpm e  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, conforme pode ser visto nas figuras 26, 27 e 28.

Observando os gráficos de superfície – resposta nota-se que a produção do pigmento extracelular está otimizada, pois a melhor produção foi obtida no ponto central, e com reprodutibilidade, pois o ponto central foi realizado em triplicata.

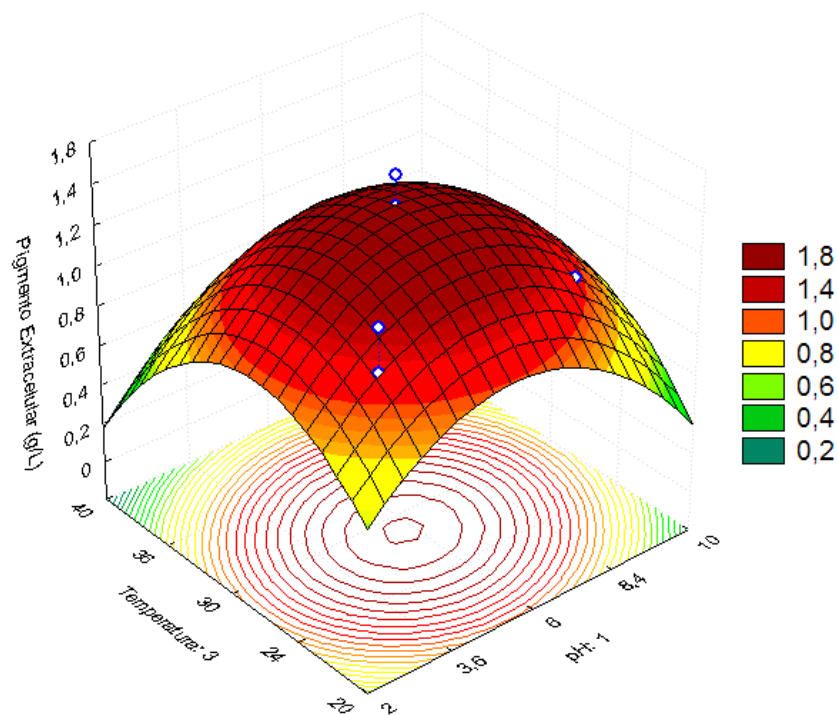


Figura 26: Superfície de resposta para a produção de pigmento amarelo em função das variações de temperatura e pH.

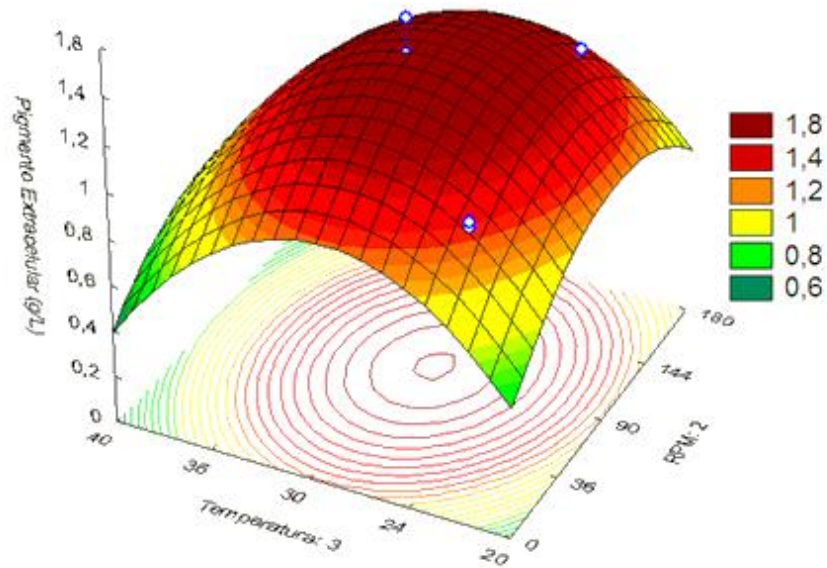


Figura 27: Superfície de resposta para a produção de pigmento amarelo em função das variações de temperatura e rpm.

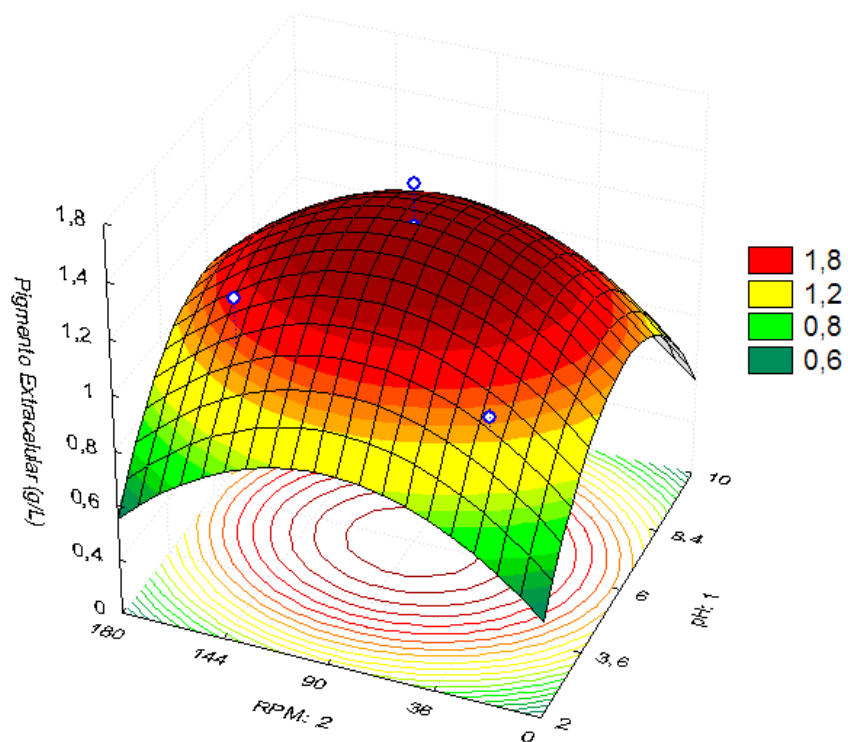


Figura 28: Superfície de resposta para a produção de pigmento amarelo em função das variações de rpm e pH.

A produção de extrato do pigmento endocelular foi muito superior a extraída do meio de cultura (extracelular), cerca de 2,5 vezes superior. Na tabela 17 estão apresentados os resultados dos ensaios, a melhor produção do extrato do pigmento endocelular foi na condição de pH 3,6, 24 °C e 36 rpm, referente ao ensaio 1, onde foi obtido o valor de 4,47 g de pigmento do micélio por litro de meio de cultura. Seguindo o ensaio 1, os ensaios 2 (pH 8,4; rpm 36; t 24 °C) e 4 (pH 8,4; rpm 144; t 24 °C) também tiveram boa produção, 3,686 g/L e 3,757 g/L respectivamente. Por outro lado, na condição de pH 6,0, 180 rpm e 30 °C, referente ao ensaio 12, foi obtida a menor produção do pigmento do micélio, 0,17 g/L.

Tabela 17: Produção do extrato de pigmento endocelular (amarelo) em g.L<sup>-1</sup> (DCCR 2<sup>3</sup>).

Ensaio	pH	RPM	T °C	Pigmento endocelular (g.L <sup>-1</sup> )	Peso seco micélio (g.L <sup>-1</sup> )
ENSAIO 1	3,6	36	24	4,471	5,76
ENSAIO 2	8,4	36	24	3,686	6,41
ENSAIO 3	3,8	144	24	1,157	6,11
ENSAIO 4	8,4	144	24	3,757	5,70
ENSAIO 5	3,6	36	36	0	0
ENSAIO 6	8,4	36	36	0	0
ENSAIO 7	3,6	144	36	0	0
ENSAIO 8	8,4	144	36	0	0
ENSAIO 9	2,0	90	30	0,914	5,74
ENSAIO 10	10	90	30	0	0
ENSAIO 11	6,0	0	30	0,371	4,36
ENSAIO 12	6,0	180	30	0,171	6,21
ENSAIO 13	6,0	90	20	0	0
ENSAIO 14	6,0	90	40	0	0
ENSAIO 15	6,0	90	30	0,986	5,14
ENSAIO 16	6,0	90	30	0,971	5,57
ENSAIO 17	6,0	90	30	1,557	5,74

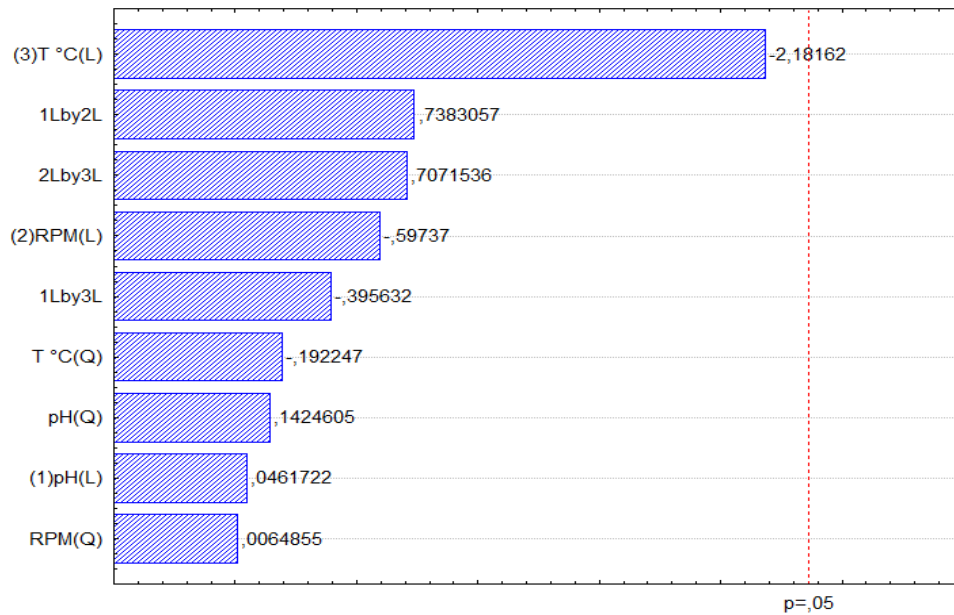


Figura 29: Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável em função da temperatura, pH e rotação (Pigmento endocelular).

Tabela 18: Efeitos e Coeficiente de regressão do DCCR 2<sup>3</sup> para produção de pigmento endocelular.

Fatores	Efeitos	Coef. de regres.	Erro Padrão	t(7)	p-valor	Estimativas por intervalo (95 %)	
						Limite Inferior	Limite Superior
Média	1,07	1,07	0,93	1,15	0,28	-1,13	3,28
pH (L)	0,04	0,02	0,43	0,04	0,96	-1,01	1,05
pH (Q)	0,13	0,06	0,48	0,14	0,89	-1,07	1,21
RPM (L)	-0,52	-0,26	0,43	-0,59	0,56	-1,29	0,77
RPM (Q)	0,006	0,003	0,48	0,006	0,99	-1,13	1,14
T °C (L)	-1,91	-0,95	0,43	-2,18	0,06	-1,99	0,08
T °C (Q)	-0,18	-0,092	0,48	-0,19	0,85	-1,23	1,04
pH x RPM (L)	0,84	0,42	0,57	0,73	0,48	-0,93	1,77
pH x T °C (L)	-0,45	-0,22	0,57	-0,39	0,70	-1,58	1,12
RPM x T °C	0,81	0,40	0,57	0,70	0,50	-0,95	1,76

Das variáveis de cultivo testadas no DCCR para a produção de pigmento endocelular observou-se que nenhuma apresentou efeito significativo, no intervalo de confiança de 95%. Observando o diagrama de Pareto (figura 29) e a tabela de regressão (tabela 18), nenhuma das variáveis, nem suas interações foram significativas ( $p\text{-value} > 0,05$ ). As variáveis que apresentaram efeito positivo foram pH (L), pH (Q), rpm (Q), bem como a interação pH (L) e rpm (L), e a interação T °C (L) e rpm (L).

Mesmo as variáveis, com a análise realizada, não sendo consideradas estatisticamente significativas, muitos ensaios tiveram produção excelente quando comparadas a literatura. A temperatura de 24 °C parece ter favorecido a produção de pigmento do micélio, pois nos ensaios 1, 2 e 4, foram observados os maiores valores de produção desse pigmento quando comparado com os demais ensaios (Tabela 17). Por isso, foi realizado um segundo planejamento experimental do tipo DCCR 2<sup>2</sup>, fixando a temperatura em 24 °C, variando a rotação de 0 a 150 rpm, e o pH de 3,0 a 9,0 (figura 30, tabela 19). A faixa de variação do pH e rotação também foi diminuída devido aos conhecimentos de cultivo do isolado de *P. mallochii* já adquiridos e também para evitar distorções nas análises dos dados.

Tabela 19: Variáveis e níveis testados no DCCR 2<sup>2</sup>.

Variáveis	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	3	3,9	6	8,1	9
Rpm	0	22	75	128	150

ENSAIO	X1 (pH)	X2 (rpm)
1	-1 (3,9)	-1 (22)
2	+1 (8,1)	-1 (22)
3	-1 (3,9)	+1 (128)
4	+1 (8,1)	+1 (128)



5	-1,41 (3,0)	0 (75)
6	+1,41 (9,0)	0 (75)
7	0 (6,0)	-1,41 (0)
8	0 (6,0)	+1,41 (150)
9	0 (6,0)	0 (75)
10	0 (6,0)	0 (75)
11	0 (6,0)	0 (75)
12	0 (6,0)	0 (75)

Figura 30: Matriz planejamento experimental completo do tipo Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR 2<sup>2</sup>.

Os resultados dos ensaios desse segundo DCCR são apresentados na tabela 20, figura 31. A melhor produção do extrato do pigmento obtido endocelular foi na condição de pH 6, e 0 rpm, referente ao ensaio 7, onde foi obtido o valor de 4,71 g de pigmento endocelular por litro de meio de cultura. Essa produção foi maior do que a do melhor ensaio do primeiro DCCR (2<sup>3</sup>). Seguindo o ensaio 7, os ensaios 12 e 9 (pH 6,0; rpm 75), ambos do ponto central, também tiveram boa produção, 3,7 g.L<sup>-1</sup> e 3,35 g.L<sup>-1</sup> respectivamente. Por outro lado, na condição de pH 3,9 e 22 rpm, referente ao ensaio 1, foi obtida a menor produção do pigmento endocelular, 0,23 g.L<sup>-1</sup>.

Tabela 20: Produção do pigmento endocelular (amarelo) em g.L<sup>-1</sup> DCCR 2<sup>2</sup>.

ENSAIO	pH	RPM	PIGMENTO ENDOCELULAR g.L <sup>-1</sup>	PESO SECO MICÉLIO g.L <sup>-1</sup>
ENSAIO 1	3,9	22	0,23	3,12
ENSAIO 2	8,1	22	0,76	2,80
ENSAIO 3	3,9	128	1,55	3,92
ENSAIO 4	8,1	128	2,62	7,21
ENSAIO 5	3,0	75	1,62	3,12
ENSAIO 6	9,0	75	2,42	2,75
ENSAIO 7	6,0	0	4,71	5,92
ENSAIO 8	6,0	150	2,75	5,79
ENSAIO 9	6,0	75	3,35	3,05
ENSAIO 10	6,0	75	2,08	3,37
ENSAIO 11	6,0	75	2,06	2,40
ENSAIO 12	6,0	75	3,70	3,20

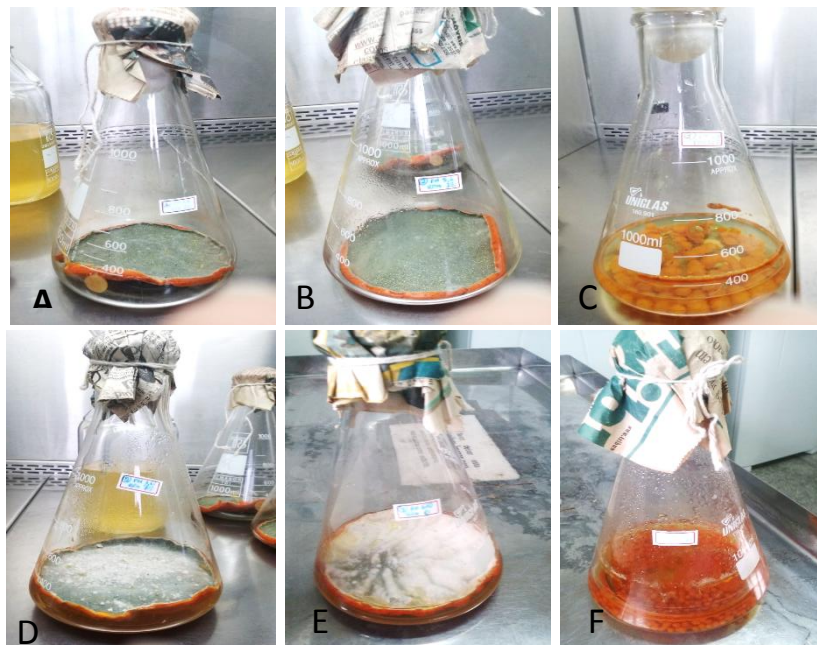


Figura 31: Ensaios do DCCR 2<sup>2</sup> após 10 dias de cultivo. (A) Ensaio 1, que obteve menor produção 0,23 g.L<sup>-1</sup>. (B) Ensaio 2, segunda menor produção 0,76 g.L<sup>-1</sup>. (C) Ensaio 3, 1,55 g.L<sup>-1</sup>. (D) Ensaio 5, 1,62 g.L<sup>-1</sup>. (E) Ensaio 7, maior produção, 4,71 g.L<sup>-1</sup>. (F) Ensaio 8, 2,75 g.L<sup>-1</sup>.

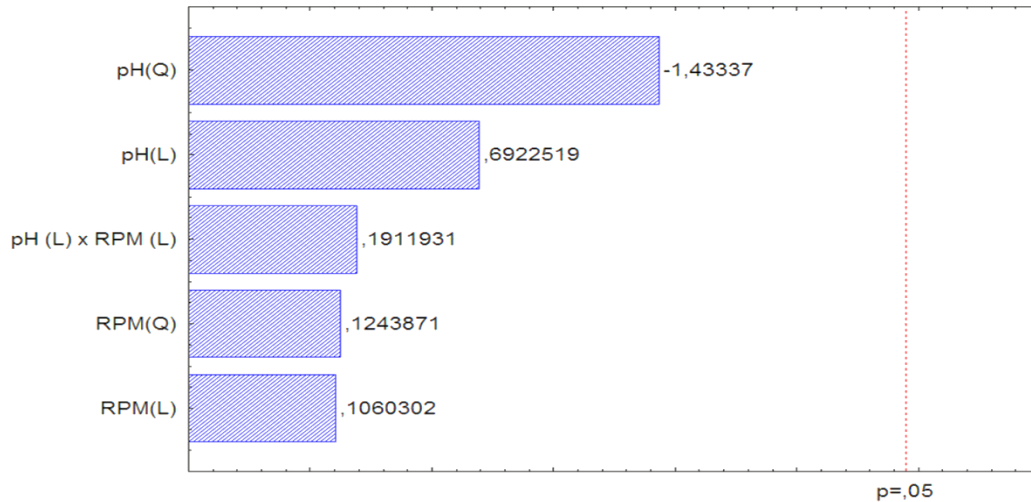


Figura 32: Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável em função do pH e rotação (DCCR 2<sup>2</sup>) (Pigmento endocelular).

Tanto a variação do pH, quanto a rotação, no segundo DCCR para a produção de pigmento no micélio não apresentaram efeitos significativos, no intervalo de confiança de 95%. O diagrama de Pareto (figura 32) e a tabela de regressão (tabela 21), mostram que nenhuma das variáveis, nem suas interações foram significativas. Todas as variáveis apresentaram efeito positivo com exceção do pH (Q).

Tabela 21: Efeitos e Coeficiente de regressão do DCCR 2<sup>2</sup> para produção de pigmento do micélio.

Fatores	Efeitos	Coef. de regres.	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Estimativas por intervalo (95 %)	
						Limite Inferior	Limite Superior
Média	2,80	2,80	0,70	4,02	0,0069	1,10	4,51
pH (L)	0,68	0,34	0,49	0,69	0,5147	-0,87	1,55
pH (Q)	-1,59	-0,79	0,55	-1,43	0,2017	-2,15	0,56
RPM (L)	0,10	0,05	0,49	0,11	0,9190	-1,16	1,26
RPM (Q)	0,14	0,07	0,55	0,12	0,9051	-1,29	1,42
pH x RPM (L)	0,27	0,13	0,70	0,19	0,8547	-1,57	1,84

Ainda que a variação do pH e rotação não tenham sido estatisticamente significativas com a análise realizada, muitos ensaios tiveram produção excelente

quando comparadas a literatura. Com o resultado desse segundo DCCR, foi possível obter ainda uma maior produção (ensaio 7)  $4,71 \text{ g.L}^{-1}$ , o que sugere que a condição ótima de cultivo para uma maior produção de pigmento do micélio seja:  $24^\circ\text{C}$ , 0 rpm e pH 6,0. Esse ensaio será validado, repetindo em triplicata.

Entre as variáveis mais importantes nos processos biotecnológicos, o pH, a temperatura e a oxigenação possuem, em condições ambientais e industriais um forte efeito sobre a biossíntese de metabólitos, tais como pigmentos. Assim, é muito importante controlá-los na indústria de bioprocessos. Metabolicamente, os efeitos do pH e da temperatura estão associados as mudanças nas atividades de proteínas, e a oxigenação com as vias de produção de energia, de modo que, controlando as condições de cultivo é possível controlar alguns processos biológicos como crescimento celular, produção de metabólitos primários e secundários, fermentação, e os processos de oxidação da célula (MENDEZ et al., 2011).

Como já apresentado junto aos dados da otimização realizada com DCCR 2<sup>3</sup>, a maior produção obtida foi a partir da extração do pigmento do micélio no ensaio 1. A produção do pigmento amarelo foi de  $4,47 \text{ g.L}^{-1}$  nesse ensaio com biomassa de  $5,76 \text{ g.L}^{-1}$ . Esses valores demonstram a viabilidade de produzir e obter pigmentos fúngicos para um possível uso, por exemplo, nas indústrias alimentícia, têxtil e de cosméticos. A tabela 22 mostra os dados cinéticos obtidos para todos os ensaios, incluindo valores de produção de pigmentos e biomassa, bem como os rendimentos da produção em relação a biomassa e substrato.

Tabela 22: Parâmetros cinéticos da produção de pigmentos nas diferentes variações de pH, rotação e temperatura testadas no DCCR 2<sup>3</sup>.

Ensaio	Pig. Micélio* (g.L <sup>-1</sup> )	Pig. Extracelular* (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa* (g.L <sup>-1</sup> )	Glicose** (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/X</sub> micélio	Y <sub>P/X</sub> extracelular	Y <sub>P/S</sub> micélio	Y <sub>P/S</sub> extracelular
Ens 1 (pH 3,6; rpm 36; t 24°C)	4,47	1,14	5,76	20	0,77	0,19	0,224	0,05
Ens 2 (pH 8,4; rpm 36; t 24°C)	3,68	0,67	5,41	20	0,68	0,12	0,18	0,03
Ens 3 (pH 3,6; rpm 144; t 24°C)	1,15	1,11	6,11	20	0,18	0,18	0,05	0,05
Ens 4 (pH 8,4; rpm 144; t 24°C)	3,75	0,78	5,7	20	0,65	0,13	0,18	0,0
Ens 9 (pH 2,0; rpm 90; t 30°C)	0,91	0,47	5,74	20	0,15	0,08	0,04	0,02
Ens 11 (pH 6; rpm 0; t 30°C)	0,37	0,62	4,36	20	0,08	0,14	0,02	0,03
Ens 12 (pH 6; rpm 180; t 30°C)	0,17	0,72	6,21	20	0,02	0,11	0,01	0,03
Ens 15 (pH 6; rpm 90; t 30°C)	0,98	1,77	5,14	20	0,19	0,34	0,04	0,08
Ens 16 (pH 6; rpm 90; t 30°C)	0,97	1,34	5,57	20	0,17	0,24	0,04	0,06
Ens 17 (pH 6; rpm 90; t 30°C)	1,55	1,4	6,74	20	0,27	0,24	0,07	0,07

\*Resultado obtido após 240 h de cultivo. \*\*Concentração de glicose utilizada no meio de cultura.

O melhor rendimento da produção do pigmento em relação a biomassa foi obtido no ensaio 1 ( $Y_{P/X} = 0,77$ ), que teve como condições de cultivo pH 3,6, 36 rpm e 24°C. Esse rendimento é considerado excelente, acima de 70%. Contudo, como já mencionado anteriormente, este ensaio não foi o que teve maior produção de biomassa. Portanto, o crescimento microbiano pode não está associado de forma proporcional a produção de pigmento. O ensaio 2 (pigmento obtido do micélio), que teve como condições de cultivo pH 8,4, 36 rpm e 24°C, foi o que obteve segundo melhor rendimento ( $Y_{P/X} = 0,68$ ). O ensaio 12 (pigmento do micélio), que teve como condições de cultivo pH 6, 180 rpm e 30°C, obteve o pior rendimento ( $Y_{P/X} = 0,02$ ).

Verificar o rendimento em relação ao consumo do substrato também é muito importante, pois a condição que melhor produzir, utilizando menos substrato é mais interessante para indústria reduz o custo do bioprocesso. Nessa análise, consideramos a concentração de glicose, fonte de carbono principal, adicionada por

litro de meio de cultura. A quantidade de glicose utilizada foi de 20 g/L, que é padrão para o meio BD. Não foi possível verificar o consumo da glicose ao longo do processo, por isso foi considerada a glicose adicionada ao meio. Em trabalhos futuros serão realizados novos planejamentos de experimentos para otimizar a produção em relação a concentração de glicose, e também outras fontes de carbono que possam reduzir os custos do processo.

O melhor rendimento em relação produção/substrato também foi o ensaio 1 ( $Y_{P/S} = 0,22$ ), que teve a maior produção, o maior rendimento em relação biomassa e maior rendimento em relação ao substrato, o que significa que a condição de cultivo em pH 3,6, 36 rpm e 24°C parece ser a melhor para obter maior quantidade de pigmento amarelo de *P. mallochii* com menor custo. No DCCR 2<sup>2</sup> que foi realizado para otimizar as variáveis pH e rotação para obter melhor produção de pigmento do micélio, o ensaio 7 apresentou melhor produção do que o ensaio 1 do DCCR 2<sup>3</sup>. Esse ensaio foi cultivado na temperatura de 24°C, ajustada para pH 6, e sem rotação, e foi obtido o valor de 4,71 g.L<sup>-1</sup> de pigmento. Para comparar esses dois ensaios supracitados os rendimentos do ensaio 7 foram calculados. Para esse ensaio os rendimentos obtidos foram  $Y_{P/X} = 0,79$  e  $Y_{P/S} = 0,23$ . O ensaio 7 do DCCR 2<sup>2</sup> obteve a melhor produção e os melhores índices de rendimento entre todas as condições testadas. Portanto, é possível dizer que, com as variáveis testadas, a condição ótima de cultivo para a produção do pigmento amarelo de *P. mallochii* é na temperatura de 24°C, sem rotação e com pH 6 inicial do meio de cultura. É necessário considerar que a produção e os rendimentos do ensaio 1 do DCCR 2<sup>3</sup> foram muito próximas a do ensaio 7 por último discutido. Por isso a condição de cultivo na temperatura de 24°C, pH 3,6 e com 36 rpm de rotação tem grande potencial para ser utilizada, nessa faixa de pH ácido, a maioria dos microrganismos não conseguem crescer, evitando problemas de contaminações no processo de produção.

Os pigmentos fúngicos são geralmente biosintetizados como metabólitos secundários. A produção de metabólitos secundários é influenciada pela fase de desenvolvimento do fungo e também pelos fatores intrínsecos e extrínsecos do ambiente, tais como substrato, composição, oxigênio, pH, atividade de água, temperatura e disponibilidade de luz (SAGARAM et al., 2006). A produção varia tanto quanto a sua química, e depende da composição do meio, aeração, agitação e

limitação de nutrientes. O excesso de fonte de carbono, por exemplo, estimula a produção de metabolitos (MAPARI, et al, 2010).

A produção de pigmento amarelo pela linhagem de *P. mallochii* testada nesse trabalho é excelente, quando comparamos com a produtividade de outras linhagens e espécies disponíveis na literatura, sendo inclusive superior ou igual a produtividade de linhagens já utilizadas com sucesso na indústria. Nos próximos parágrafos serão apresentados alguns exemplos de produção na bancada e na indústria, bem como trabalhos para fins de comparação de condições de cultivo e produtividade.

Dufossé, em sua revisão de literatura sobre pigmentos fúngicos em alimentos publicada em 2006, elenca algumas espécies/gêneros fúngicos e sua produtividade. O fungo *Blakeslea trispora* produz níveis elevados de b-caroteno até 30 mg de b-caroteno por grama de massa seca ou cerca de 3 g.L<sup>-1</sup>, e é produzido industrialmente na Rússia, Ucrânia, Espanha e Bélgica. Existem muitas patentes referentes ao pigmento Arpink Red <sup>TM</sup> de *Penicillium oxalicum* depositadas pela Ascolor Biotech s.r.o. (República Checa). Propõem uma nova estirpe de fungo com as propriedades para produzir um pigmento vermelho que pode ser aplicado nas indústrias de alimentos e cosmética. As condições ideais de cultivo descritas para a produção do pigmento são: valor de pH 5,6 a 6,2; e a temperatura de 27 a 29 °C. No segundo dia de incubação um corante vermelho é excretado para o caldo, chegando até 1,5-2,0 g.L<sup>-1</sup> de caldo após 3-4 dias. Esse pigmento é estável em pH acima de 3,5, sendo que as soluções neutras são estáveis mesmo após 30 min em ebulição. A riboflavina (vitamina B2) tem uma variedade de aplicações como um corante alimentar amarelo. Existem numerosos microrganismos que produzem riboflavina em fermentação. A fermentação de riboflavina pode ser classificada em três categorias de acordo com sua produção: produtores fracos (100 mg.L<sup>-1</sup> ou menos, ex. *Clostridium acetobutylicum*); moderado produtores (até 600 mg.L<sup>-1</sup>, por exemplo, leveduras tais como *Candida Guilliermondii* ou *Debaryomyces subglobosus*); e forte produtores (mais de 1 g . L<sup>-1</sup> , por exemplo, os fungos *Eremothecium Ashbyii* e *Ashbya gossypii*).

A patente WO 2012/022765 A1 (MAPARI et al., 2012) descreve a produção de pigmentos por várias espécies de *Penicillium*, com alta C/N e pH de 5 a 8. Nessa patente a melhor produção apresentada foi de um isolado de *P. aculeatum* que

produziu 4,8 g/L de pigmento em pH 6. Os demais isolados testados, e este mesmo em outras condições, produziram bem abaixo, com valores menores que 100 mg/L.

Mendez et al. (2011) realizaram estudos para verificar a influência da temperatura e do pH na produção de pigmentos vermelhos por *Penicillium purpurogenum* GH2. A maior produção de pigmento vermelho (2,46 g.L<sup>-1</sup>) foi atingida com um valor de pH 5 e temperatura de 24 ° C. Eles também não acharam relação proporcional entre a produção de biomassa e pigmento vermelho. Cho et al (2002) mostraram uma produção de pigmento vermelho de 4,40 g.L<sup>-1</sup> utilizando um isolado de *Paecilomyces sinclairii* com meio de cultura ajustado para o pH 6. Mukherjee e Singh (2011) obtiveram 0,07 g.L<sup>-1</sup> de pigmento vermelho de *Monascus purpureus* em pH5, enquanto Jens et al. (2012) obtiveram 0,13 g.L<sup>-1</sup> usando *Penicillium funiculosum* IBT3954 8. *Penicillium* sp. produziu em pH 5, pigmento cor violeta 0,20 g.L<sup>-1</sup> (Ogihara et al., 2000). Lucas et al. (2010) obtiveram 0,31 g.L<sup>-1</sup> de pigmento laranja de *Penicillium sclerotiorum*.

No trabalho desenvolvido por Chatterjee et al. (2009) observou-se que a produção de pigmento vermelho foi máxima a 30 °C. A qualidade do pigmento variou notavelmente com a alteração do pH, sendo o pigmento vermelho foi mais pronunciado no pH 6,0, mas o pH ácido propiciou a produção de pigmento amarelo. Enquanto o pH inicial era baixo (2,0 - 4,0), o pigmento amarelo estava dominando. Bum-Kyu Lee et al., 2001 trabalharam com os pigmentos vermelhos de *Monascus*, e verificaram o favorecimento da produção num amplo intervalo de pH, de 5,5 a 8,5. Gunasekaran e Poorniammal (2008), testaram linhagens do gênero *Penicillium* para a produção de pigmento vermelho. A condição ótima para a produção foi pH 9,0, temperatura 30 °C, e agitação 200 rpm. A patente PI1000262-6 A2 publicada em 2010, trata da produção de pigmento vermelho com *Monascus purpureus* em fermentação submersa. O processo de produção ocorre na temperatura 25 a 35 °C, pH de 4 a 7, agitação 100 a 300 rpm e utilizando peróxido de hidrogênio para aeração.



#### 4.7 Análise química para identificação de moléculas

Para dar continuidade com a análise química, optou-se por trabalhar primeiro com o isolado de *P. mallochii* que produz o pigmento amarelo, devido à alta produtividade obtida no planejamento experimental anterior. A análise química do pigmento vermelho será realizada em momento posterior. Foram realizadas cromatografias de camada delgada com o extrato hexânico, para conhecer sua composição e escolher o melhor sistema de solvente para a separação de seus componentes, para então em seguida realizar a separação em coluna filtrante. O melhor sistema de solvente testado foram hexano 90% : metanol 10% e hexano 80% : metanol 20% (figura 33). Como mostra a figura 33, pode –se notar a presença de duas bandas fluorescentes, uma de cor amarela forte e duas marrons. Entre os sistemas testados, o sistema hexano / metanol foi o que melhor separou o extrato, e que será utilizado para a cromatografia de coluna filtrante.

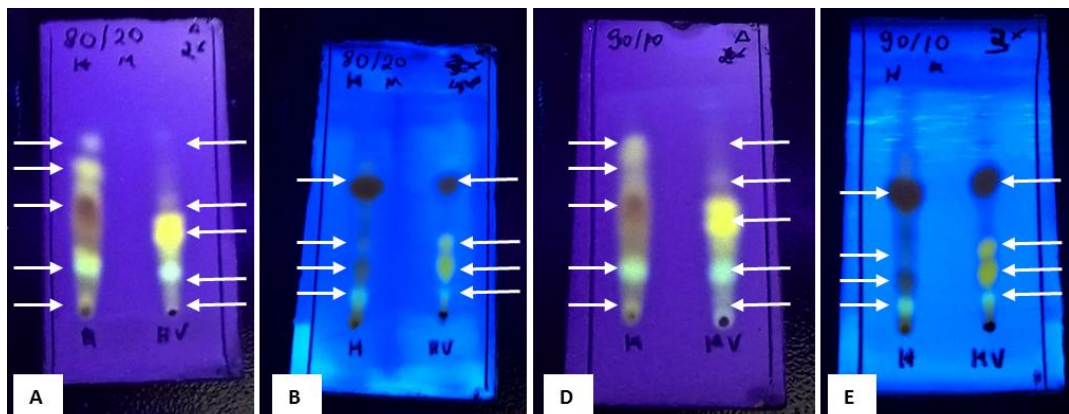


Figura 33: Placas de CCDC com o extrato hexânico do isolado EARIM3A. (A) Sistema de solvente hexano / metanol 80:20, com duas corridas. (B) Sistema de solvente hexano / metanol 80:20, com quatro corridas. (C) Sistema de solvente hexano / metanol 90:10, com duas corridas. (D) Sistema de solvente hexano / metanol 90:10, com quatro corridas.

O extrato hexânico (18,051 g), foi submetido a uma coluna filtrante (figura 34), utilizando como sistema eluente hexano/metanol em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 64 frações de 100 a 250 mL que foram concentradas em rotaevaporador, e foram novamente analisadas por CCDC, usando os sistemas de solventes: hexano 90%: acetato 10% (figura 36); hexano 70% : acetato de etila 30% (figura 35); hexano 90% : metanol 10% (figura 37); e hexano 80%: metanol 20% (figura 38). A partir da análise das plaquinhas de CCDC algumas frações foram

selecionadas para a realização de análises espectroscópicas para elucidação da classe e estrutura química. Os resultados dessas análises serão apresentados nos próximos trabalhos. Os espectros de RMN dessas frações são apresentados nas figuras 39 a 47.

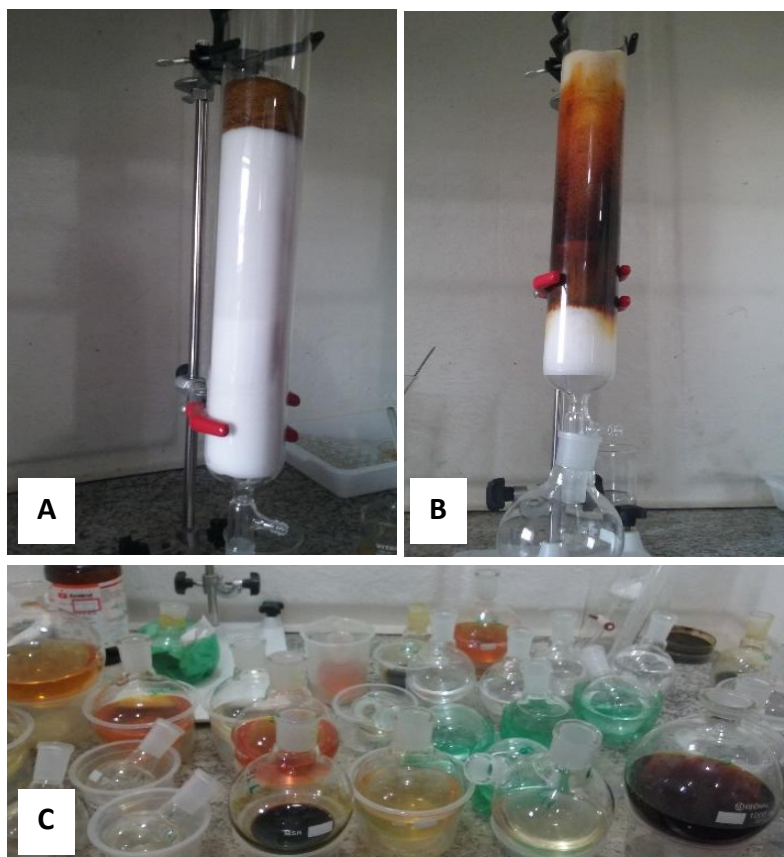


Figura 34: Separação do extrato hexânico de EARIM3A por coluna filtrante. (A) Coluna empacotada. (B) Coluna filtrante em andamento com o eluente hexano/metanol. (C) Frações obtidas.

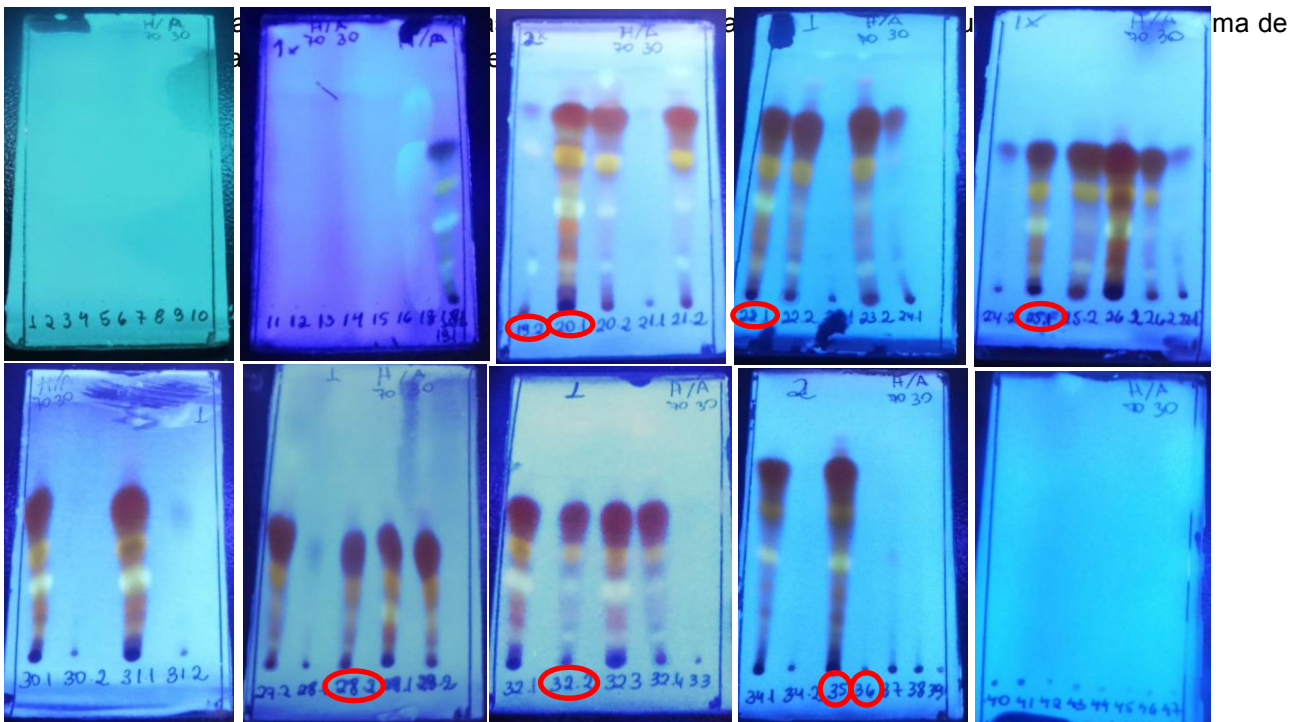


Figura 35: Placas de CCDC com as frações obtidas na separação em coluna utilizando o sistema de solvente hexano 70% : acetato de etila 30%. Estão destacadas com um círculo vermelho as frações selecionadas para fazer RMN e CG-MS.

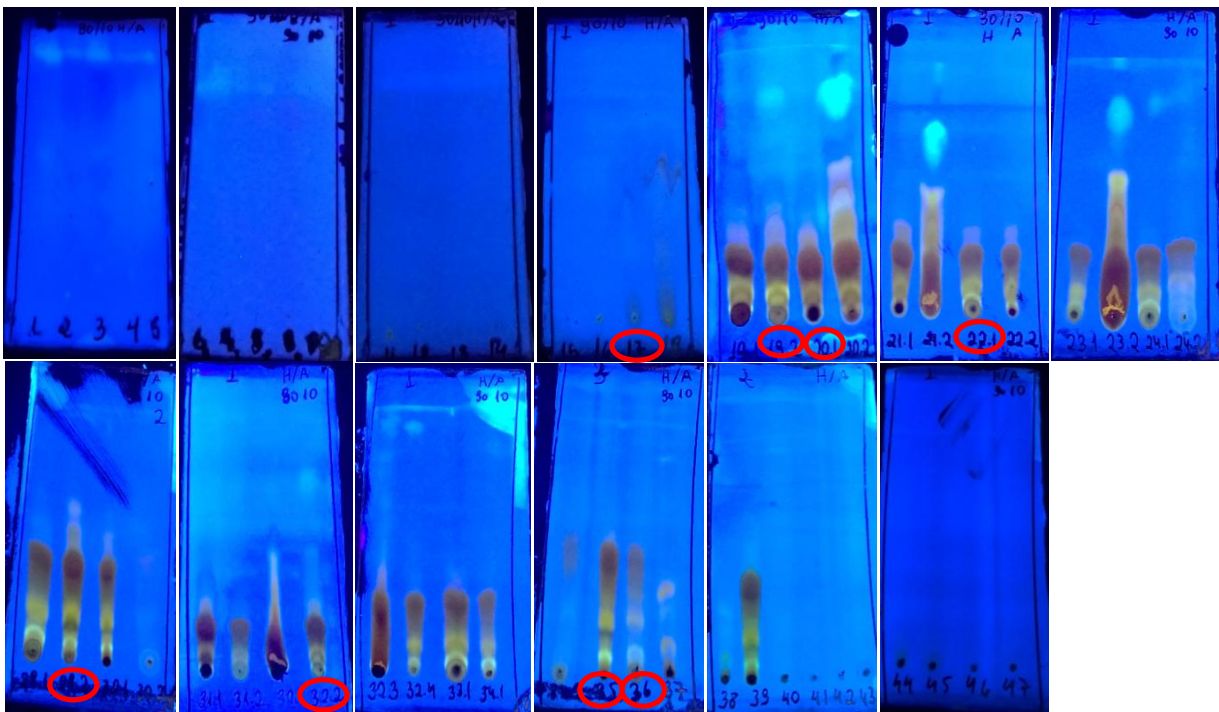


Figura 36: Placas de CCDC com as frações obtidas na separação em coluna utilizando o sistema de solvente hexano 90% : acetato de etila 10%. Estão destacadas com um círculo vermelho as frações selecionadas para fazer RMN e CG-MS.

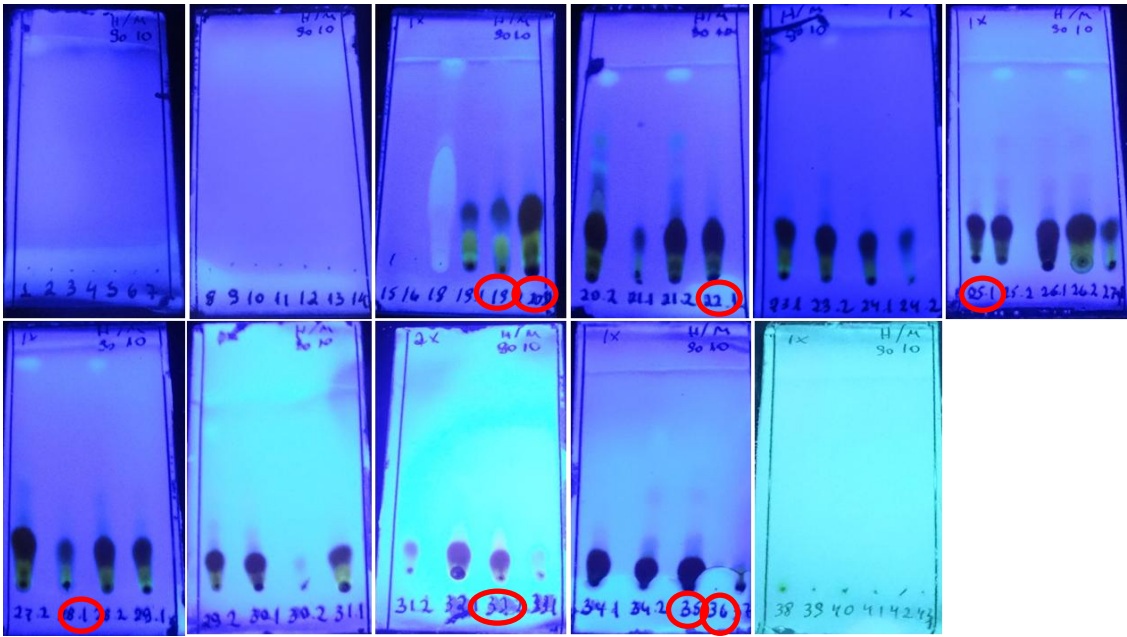


Figura 37: Placas de CCDC com as frações obtidas na separação em coluna utilizando o sistema de solvente hexano 90% : metanol 10%. Estão destacadas com um círculo vermelho as frações selecionadas para fazer RMN e CG-MS.

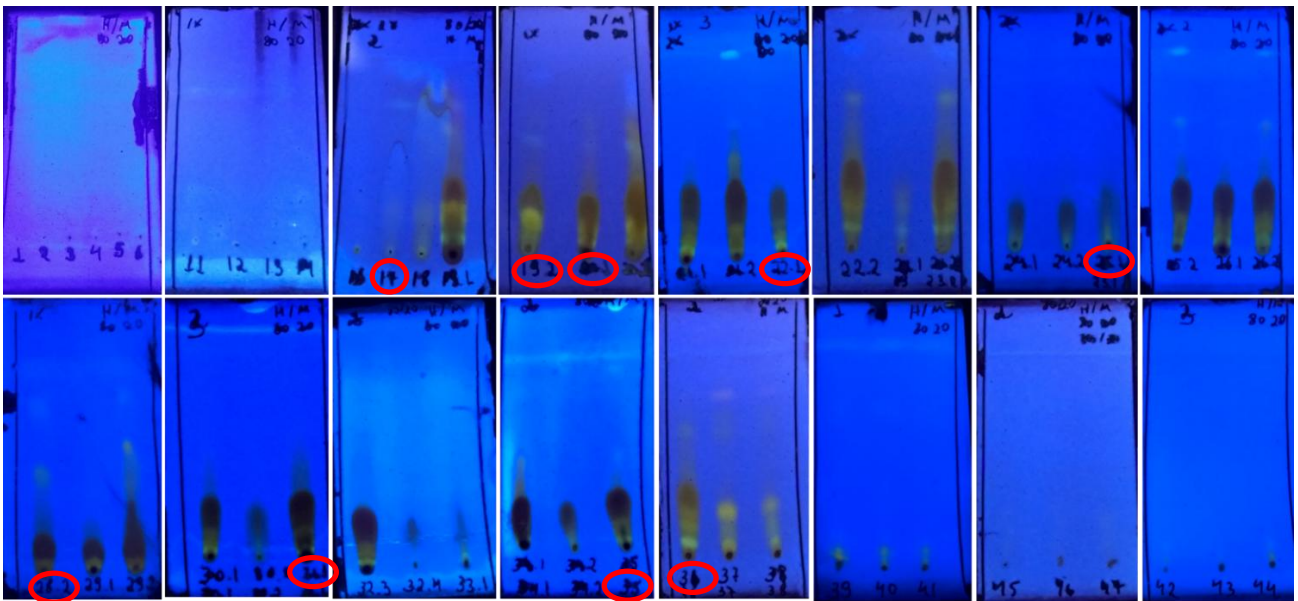


Figura 38: Placas de CCDC com as frações obtidas na separação em coluna utilizando o sistema de solvente hexano 80% : metanol 20%.

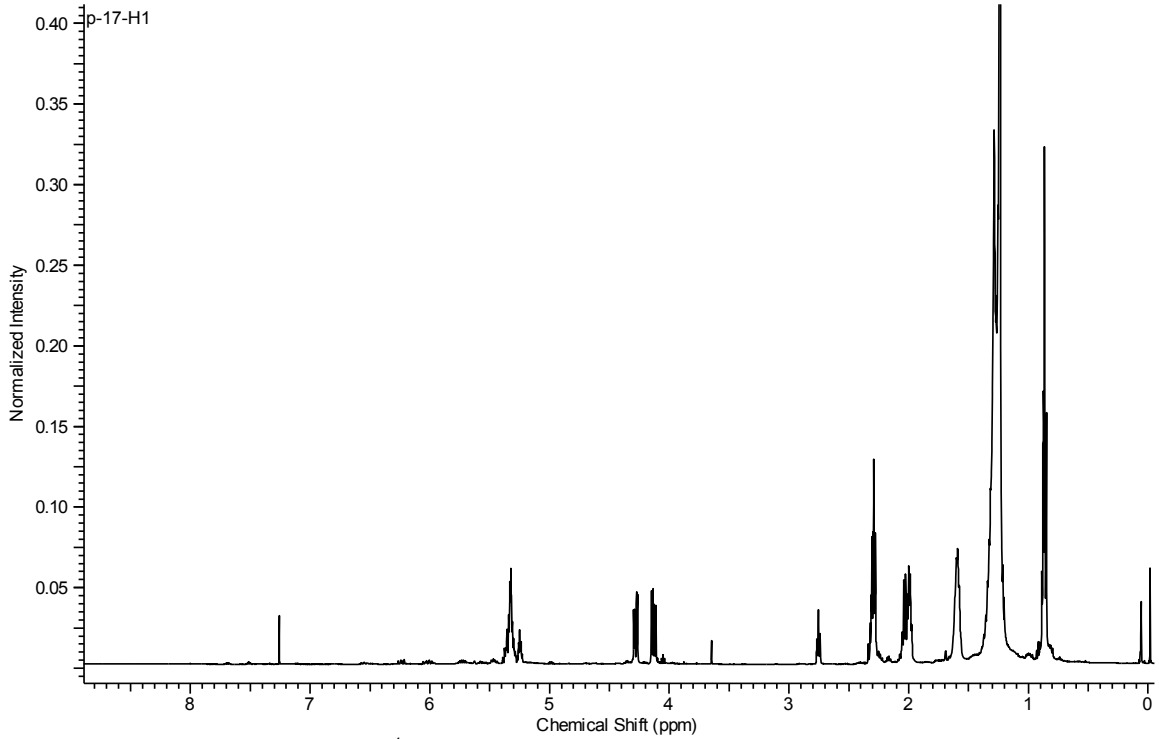


Figura 39: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da fração 17 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ(ppm)].

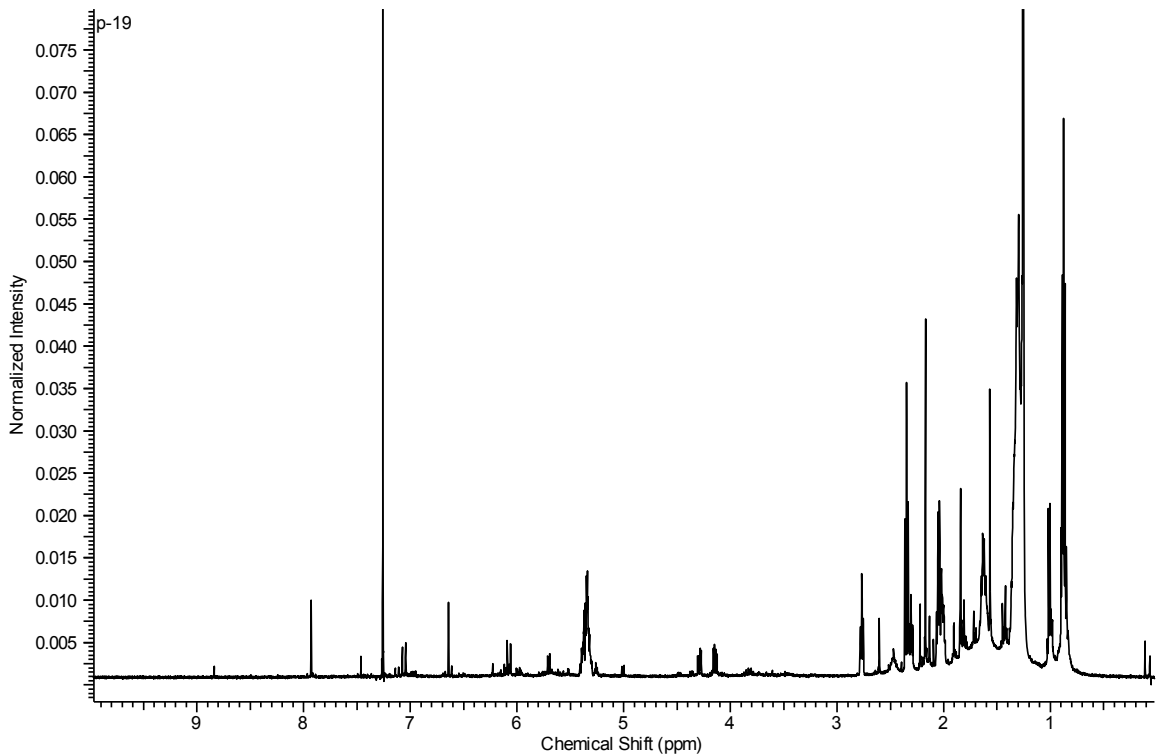


Figura 40: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da fração 19.2 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ(ppm)].

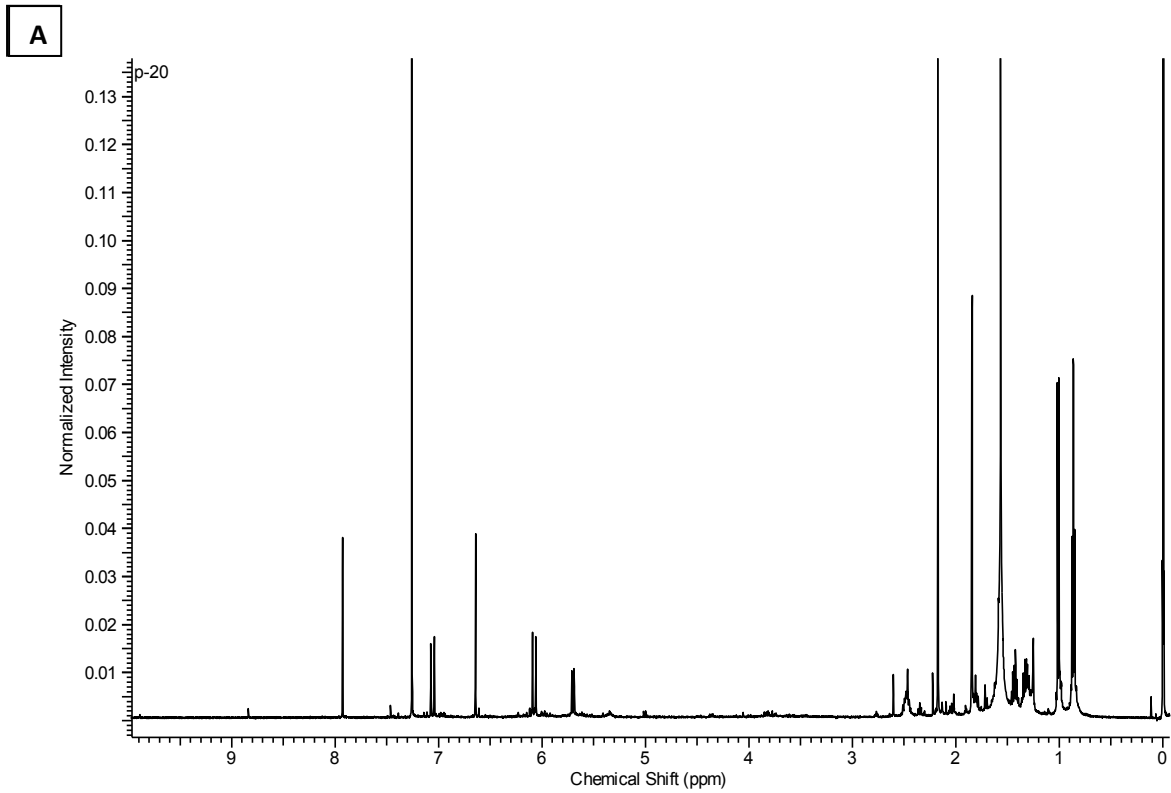
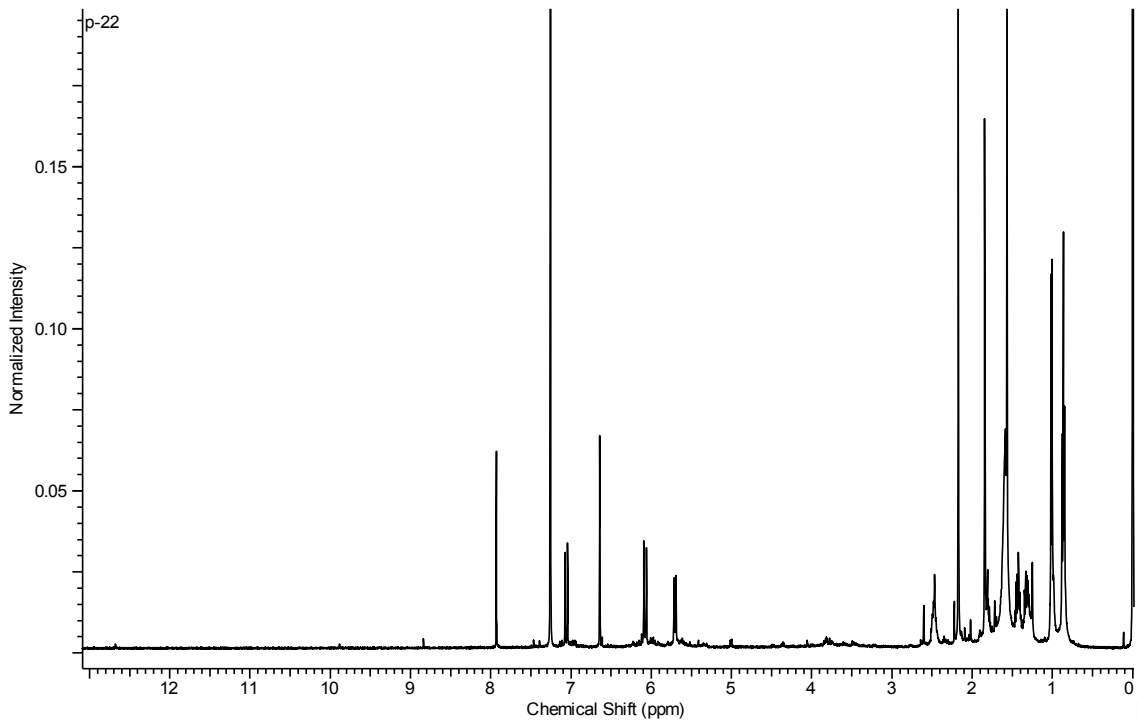
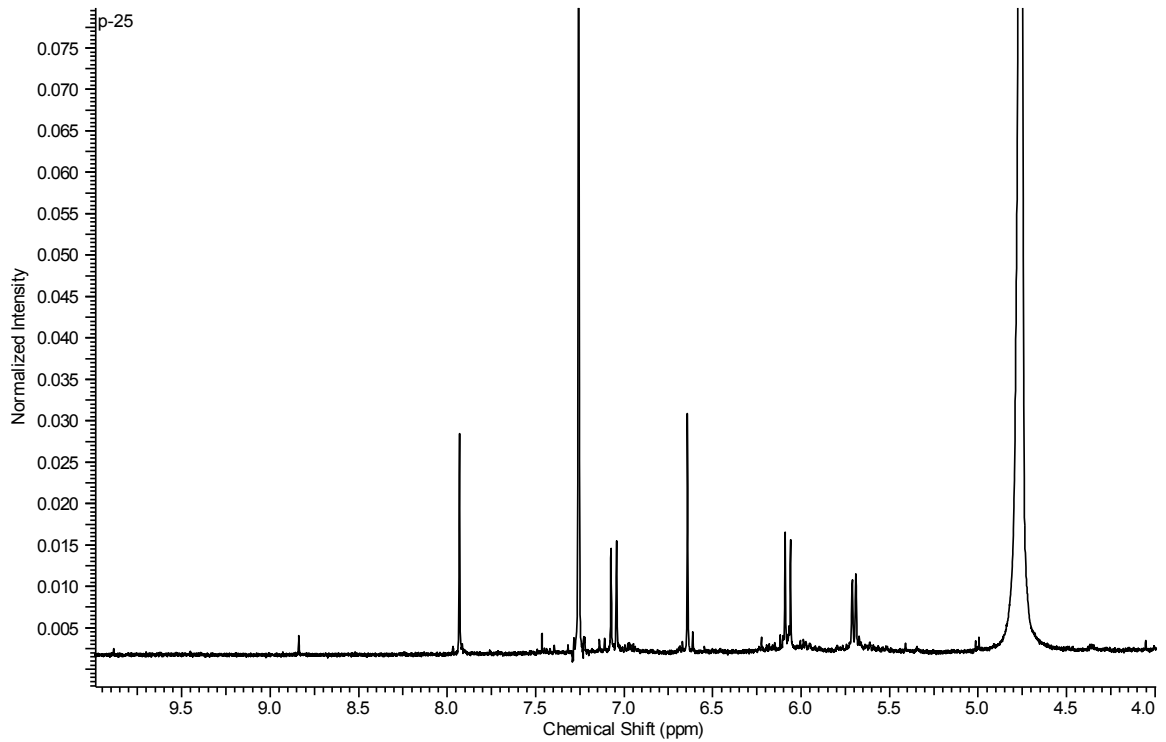
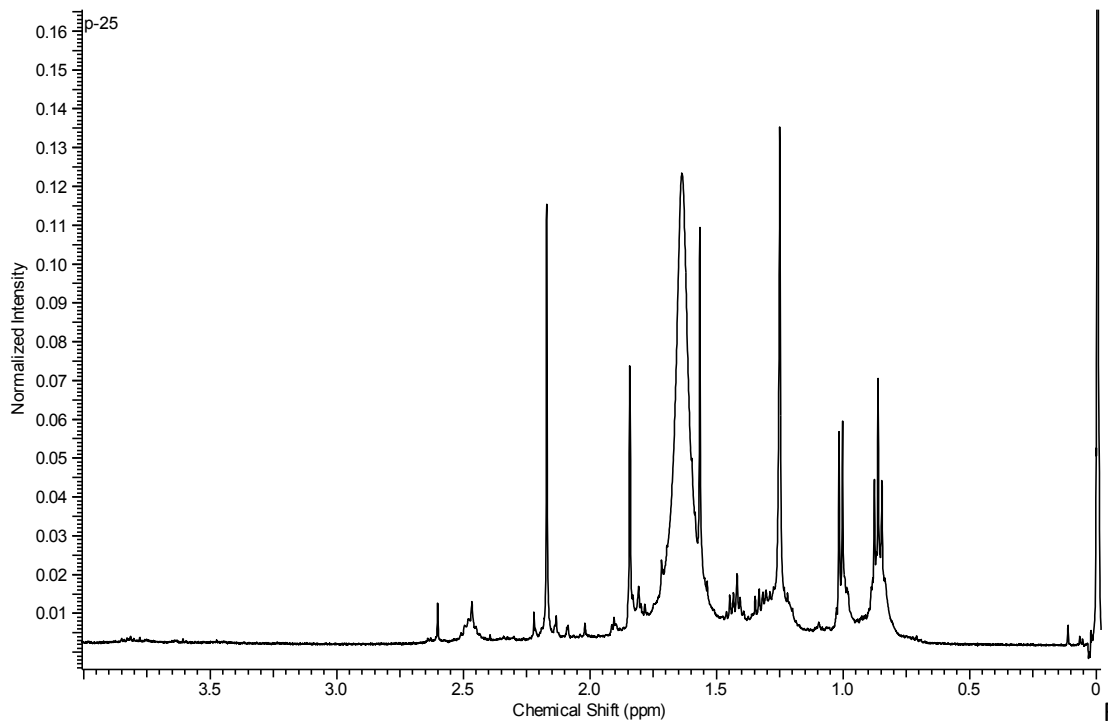


Figura 41: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 20.1 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ (ppm)].



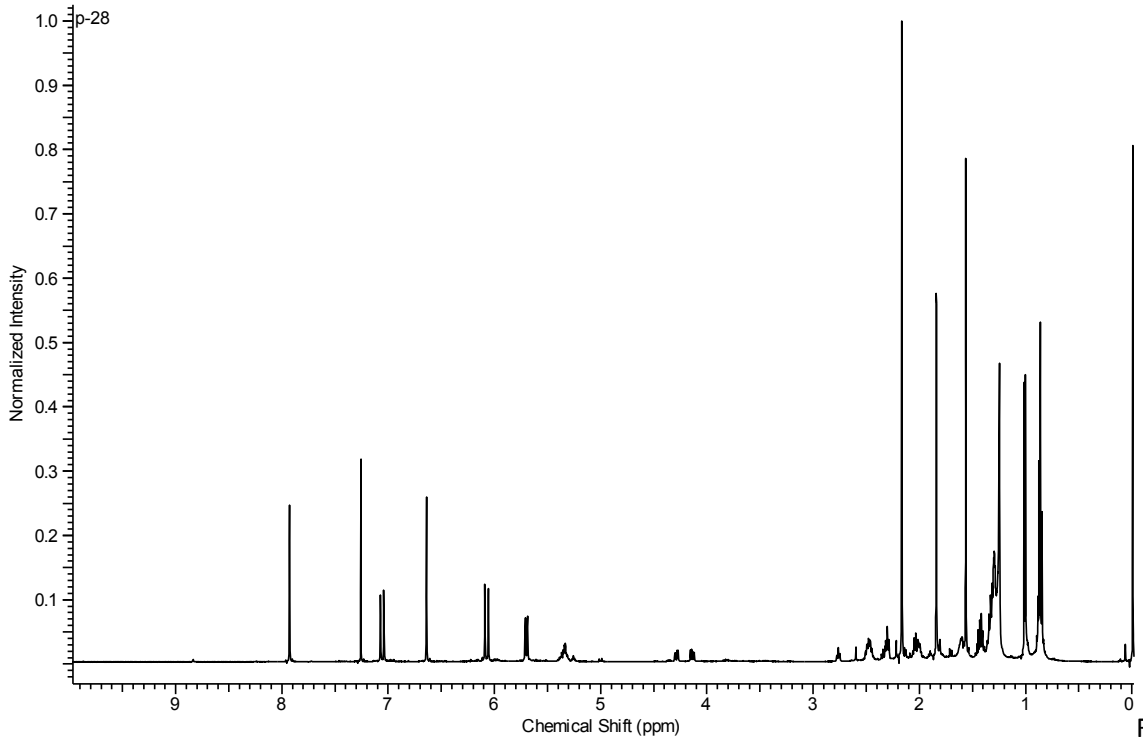
Figura

42: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 22.1 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ (ppm)].

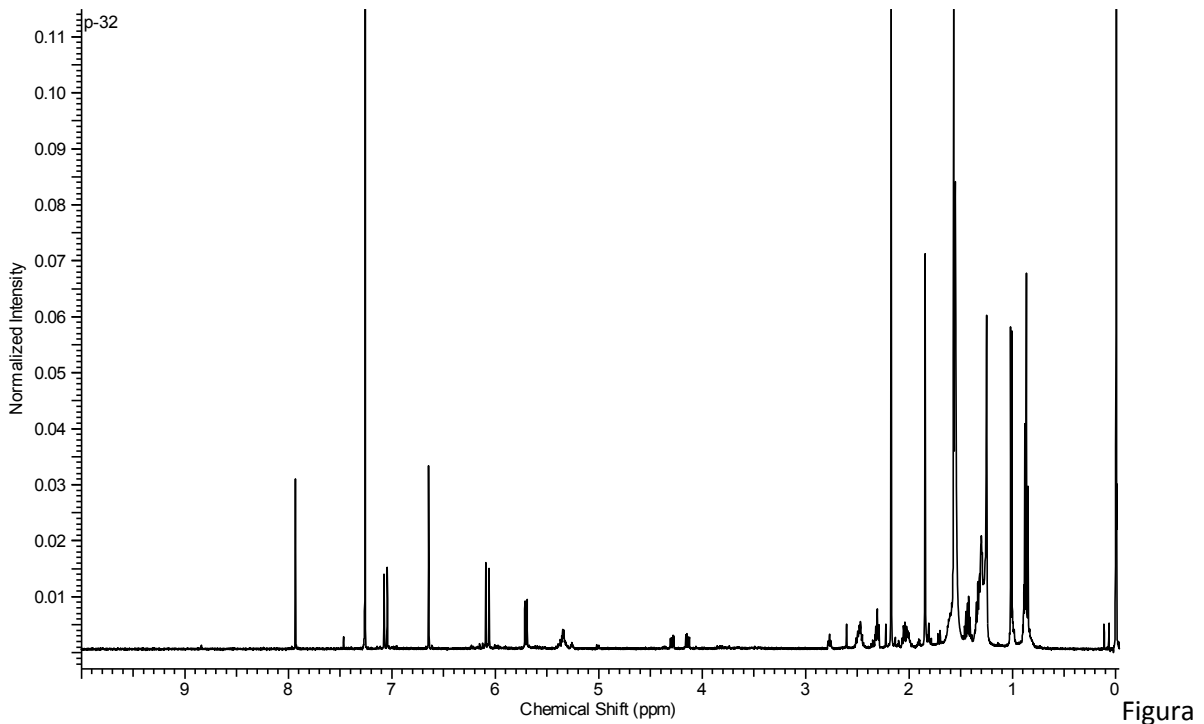
**A****B**

Figura

43: (A-B) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 25.1 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ ].



44: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 28.2 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ (ppm)].



45: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 32.2 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo [500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ (ppm)].



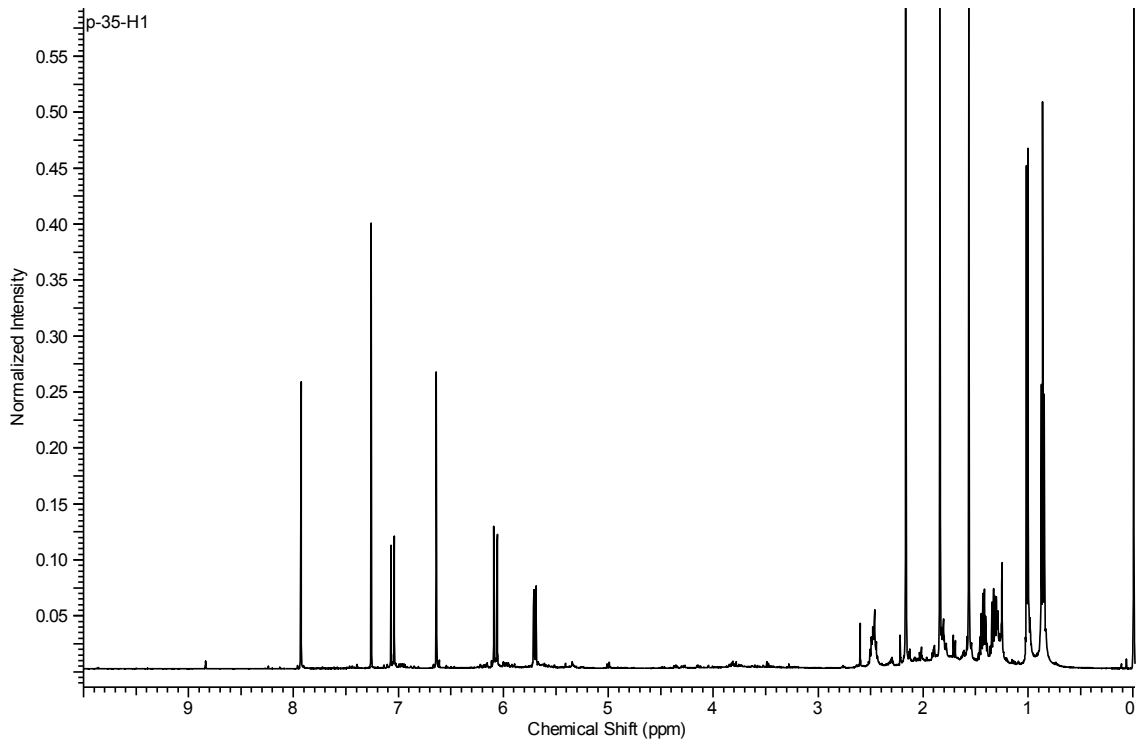


Figura 46: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da fração 35 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo. [500MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ(ppm)].

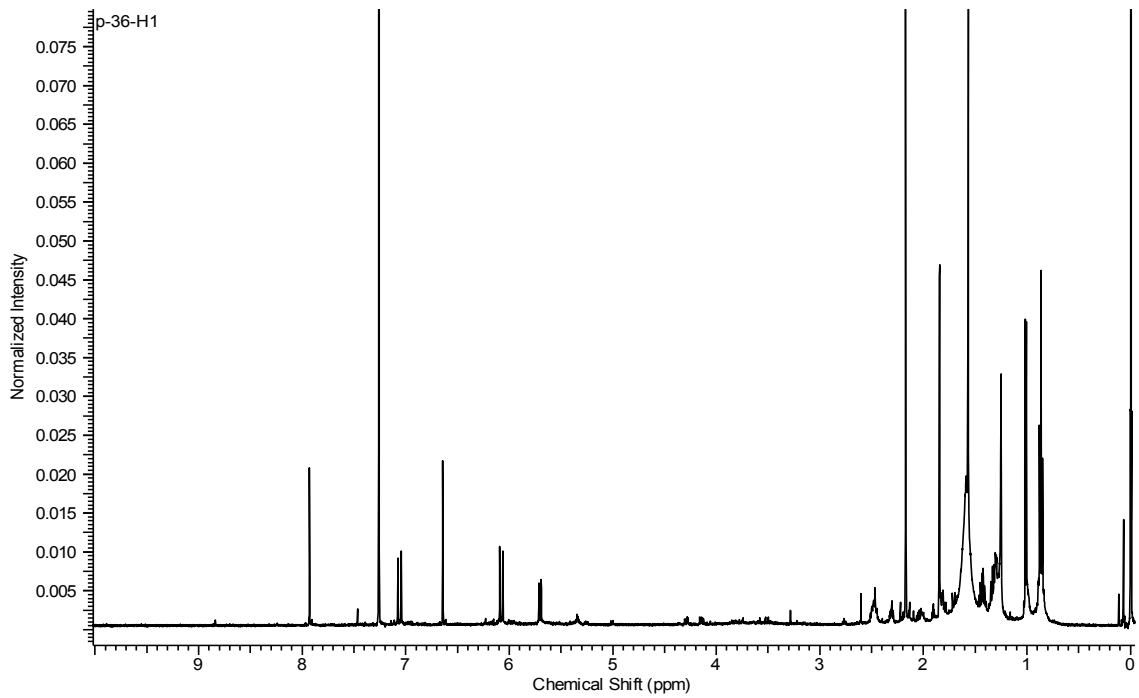


Figura 47: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da fração 36 obtida da separação em coluna do extrato hexânico do pigmento amarelo. [500MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ(ppm)].

#### 4.8 Teste de estabilidade da cor

Em muitos casos, as variações de estabilidade do pigmento natural em relação ao calor, luz e pH limitam a aplicação destes em certos tipos de produtos, pois não conseguem satisfazer os requisitos de estabilidade da cor (MAPARI et al., 2010), por isso ainda é preterido pela indústria que ainda preferem usar os corantes artificiais, mesmo que estes possam ser prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. Portanto para prospectar um novo pigmento natural é muito importante verificar sua estabilidade frente a essas possíveis alterações.

Para testar a estabilidade da cor dos pigmentos estudados nesse trabalho a alterações de temperatura e exposição à radiação U.V. foram feitos alguns testes a partir dos métodos físicos de controle microbiano muito utilizados pelas diversas indústrias para esterilizar, desinfestar ou cessar o crescimento de microrganismos que podem causar alterações negativas nos produtos. Com o extrato e filtrado do pigmento amarelo, foi possível observar que não ocorreram alterações significativas na cor, corroborada com os dados obtidos com a análise quantitativa com o espectrofotômetro, como mostra a figura 48, os dados de absorbância não sofreram variações significativas depois dos tratamentos.

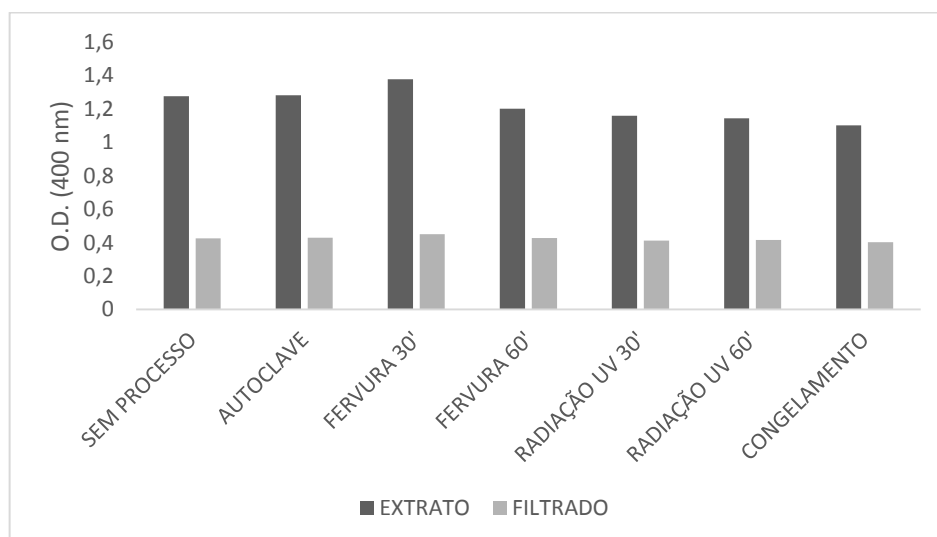


Figura 48: Resultados do teste de estabilidade do pigmento amarelo as alterações de temperaturas da autoclavagem, fervura e congelamento, e a exposição à radiação UV. Comparação da O. D. antes dos processos e posterior aos processos no comprimento de onda de 400 nm.

Com o filtrado do pigmento vermelho, também foi possível observar que não ocorreram alterações significativas na cor, corroborada com os dados obtidos com a análise quantitativa com o espectrofotômetro, como mostra a figura 49, os dados de absorbância não sofreram variações significativas depois dos tratamentos.

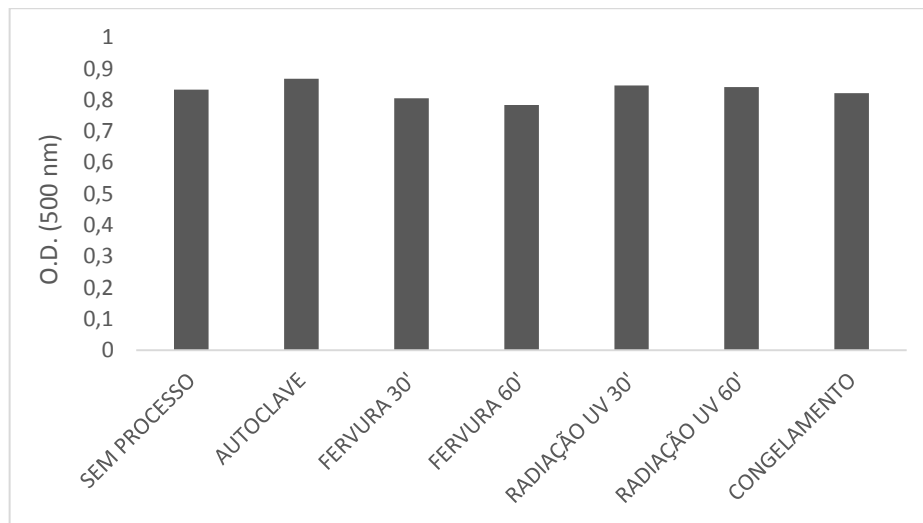


Figura 49: Resultados do teste de estabilidade do pigmento vermelho as alterações de temperaturas da autoclavagem, fervura e congelamento, e a exposição à radiação UV. Comparação da O. D. antes dos processos e posterior aos processos no comprimento de onda de 500 nm.

Com relação a estabilidade da cor do pigmento amarelo às alterações de pH, foi possível perceber qualitativamente que não houve mudança significativa a cor (figura 50), com exceção no pH 10, onde o amarelo tornou-se mais claro. Ao fazemos a análise quantitativa no espectrofotômetro percebeu-se uma pequena variação, mostrada na tabela 23 e figura 51, que demonstram que quanto mais ácido o meio, maior a intensidade do amarelo. Quanto mais básico o meio, menor a intensidade da cor amarela, com exceção do pH 8,0, onde a cor amarela foi intensificada. A O.D. 2,154 foi a máxima atingida no pH 2,0. Já o pH 10 teve a O.D. 1,651, a menor obtida. Percebe-se que o pigmento amarelo obtido tem uma boa estabilidade em relação a alterações de pH, pois as alterações da O.D. medida foram pequenas, e não impactaram na cor refletida que continuou na faixa do amarelo, com exceção da solução pigmentada ajustada para o pH 10, que se tornou

amarelo mais claro. Esse pigmento tem potencial para a utilização em produtos em ampla faixa de pH sem que perda da cor.

Com relação a estabilidade da cor do pigmento vermelho às alterações de pH, notou-se uma alta variação em relação aos pHs testados. Qualitativamente, foi possível observar que nas amostras com o pH mais ácido, 5, 4, e 3, o vermelho foi ficando cada vez mais claro até se tornar amarelo no pH 2. Nas soluções ajustadas para o pH 10, 9, 7, e 6 o vermelho se tornou muito mais intenso, passando a vermelho escuro (figura 50, 52). A coloração observada foi corroborada com a medição da O.D. da solução com cada pH testado conforme tabela 22. A solução com pH 2 foi a que obteve menor O.D. (0,249), e foi a amostra que deixou de ter a coloração vermelha e passou a ser amarela. Em seguida veio a solução com o pH 3 com O.D. 0,598, que ficou com uma coloração vermelho bem claro quase se tornando amarelo. As soluções com o pH 6, 7, 9 e 10, que se tornaram vermelho escuro, obtiveram as maiores O.D.: 1,334, 1,425, 1,487 e 1,389 respectivamente. Notou-se que esse pigmento vermelho possui certa instabilidade a alterações de pH, tem potencial para a utilização em produtos com pH próximo ao neutro e básico sem que perda da cor.

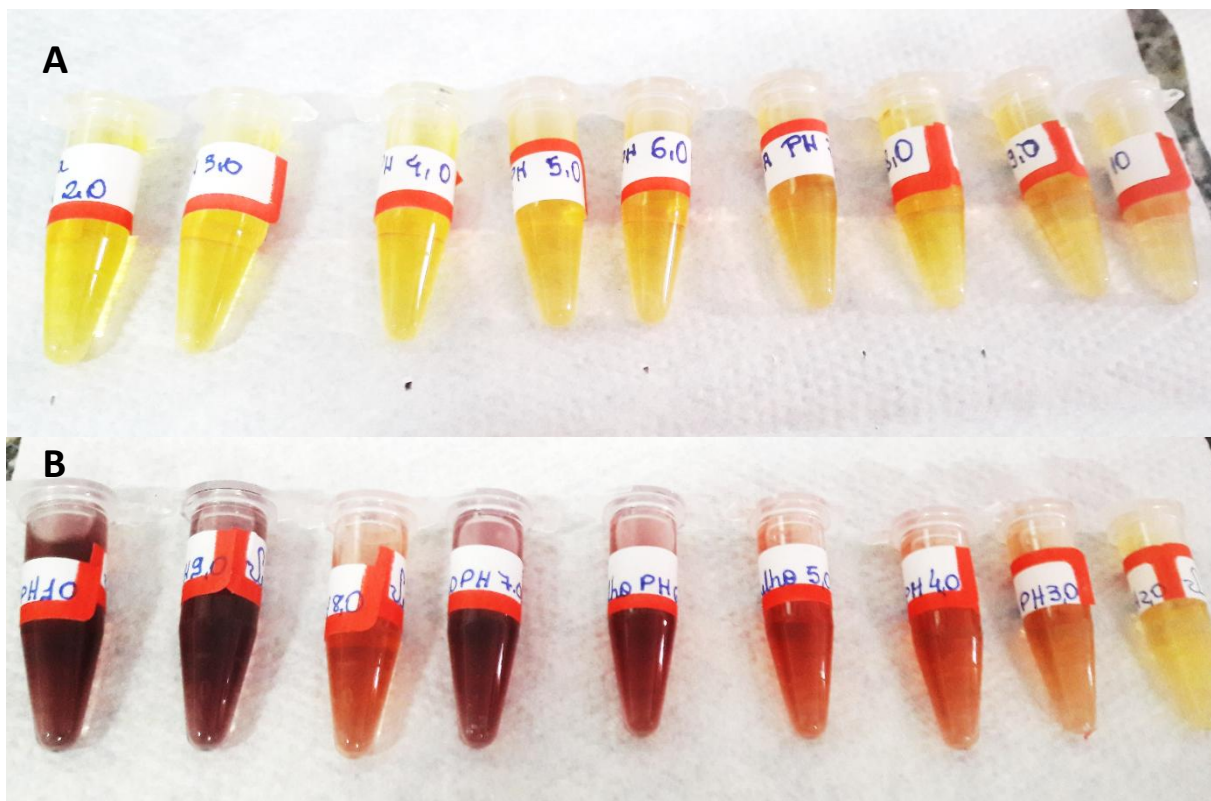


Figura 50: Comparação qualitativa da cor do pH 2 ao 10. (A) pigmento amarelo produzido pelo isolado EARIM3A. (B) pigmento vermelho produzido pelo isolado EARIM9A.

Tabela 23: Variação da Densidade Óptica O.D. em função da alteração do pH.

pH	Pig. Amarelo	Pig. Vermelho
	O.D. (400 nm)	O.D (500 nm)
2	2,154	0,249
3	2,096	0,598
4	1,945	0,953
5	1,851	1,039
6	1,905	1,334
7	1, 825	1,425
8	2,101	0,901
9	1,87	1,487
10	1,651	1,389

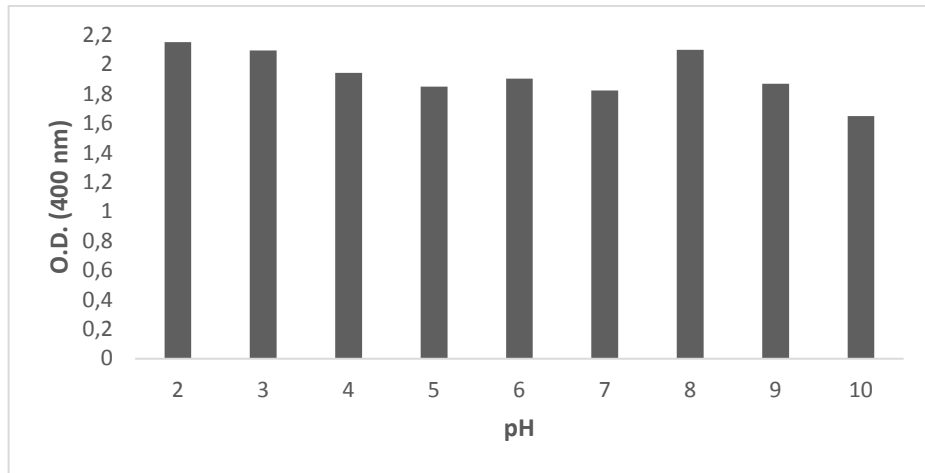


Figura 51. Gráfico mostrando a variação da O.D. da solução com pigmento amarelo em função da variação de pH.

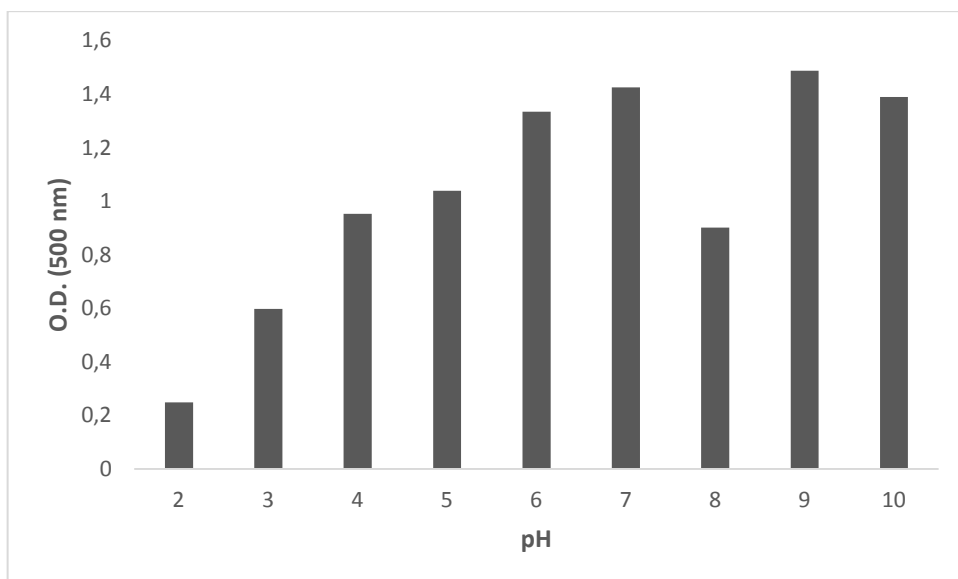


Figura 52. Gráfico mostrando a variação da O.D. da solução com pigmento vermelho em função da variação de pH.

Para absorver luz e provocar uma cor visível ao olho humano, a maioria dos pigmentos naturais utilizados são compostos altamente insaturados e são, portanto, propensos a alterações na sua cor quando expostos à luz, calor e oxigênio e

alterações de pH (MORTENSEN, 2006). No entanto, existem grandes diferenças na estabilidade entre as diferentes classes de corantes alimentares naturais existentes (SPEARS, 1988). Em muitos casos, os problemas de estabilidade em relação ao calor, luz e pH limitam o período de aplicação de certos pigmentos naturais a certos tipos de produtos. Por conseguinte, existe uma grande margem para a descoberta de pigmentos naturais estáveis que podem ter aplicações industriais mais amplas, que é o objetivo desse trabalho.

A maior parte da literatura disponível que trata de fungos produtores de pigmentos para uso alimentar apontam os pigmentos produzidos pelo *Monascus* como exemplo bem-sucedido, já que este tem ampla aplicação e utilização no continente asiático a mais de um século, variando do amarelo ao vermelho. Esses pigmentos são considerados bons corantes alimentares porque são estáveis na gama de pH de 2-10, e ao processo de autoclavagem (BLANC et al., 1994; TENG e FELDHEIM, 1998). Um relatório sobre características e estabilidade pigmentos produzidos por *Monascus anka* descreve que estes pigmentos eram estáveis sob UV e luz fluorescente, mas eram muito sensíveis à luz solar (KIM et al., 1997). O mesmo estudo ainda relata que os ácidos tartárico e cítrico eram prejudiciais para a cor desses pigmentos. Íons de cobre também podem causar alterações na cor destes pigmentos. Além desse relato, outros trabalhos (JUNG et al., 2003; JUNG et al., 2005) descrevem essas características da cor dos pigmentos do *Monascus* e o aumento da foto estabilidade para melhorar a sua aplicação industrial. Mapari et al., (2009) testaram a foto estabilidade dos pigmentos produzidos por *Penicillium* e *Epicoccum* em meio similar à um refrigerante tipicamente utilizado pela indústria de corantes alimentares, nos quais o efeito do pH também pode ser estudado. Esse trabalho mostrou que o padrão quantitativo e qualitativo de alteração de cor dos extratos de pigmentos fúngicos possuem foto estabilidade maior do que os extratos de pigmentos naturais disponíveis comercialmente: vermelho de *Monascus* e açafrão usados como controles. Componentes amarelos do extrato de pigmento fúngico mostraram ser mais foto estáveis do que os componentes vermelhos.

#### 4.9 Detecção de micotoxinas

Um dos principais problemas que impedem a ampla utilização de pigmentos fúngicos nas indústrias é a liberação do uso pelos órgãos de controle. A restrição imposta por esses órgãos na maioria das vezes deve-se a produção de micotoxinas por espécies fúngicas de interesse.

No extrato do pigmento amarelo produzido por *P. mallochii* não foram encontrados traços das micotoxinas Ácido penicílico, Citrinina e Patulina, ou suas concentrações estão abaixo do limite de detecção da metodologia. Esse resultado pode ser visto no laudo emitido pelo LAMIC que está no anexo 1, ou em recorte do laudo na figura 54.

Amostra: 05P/16		Extrato. EARIM3A. Data Coleta set/16.	
RESULTADOS µg/kg (ppb)			
Ác. Penicílico	Patulina	Citrinina	
<LD	<LD	<LD	
Informação			
O LAMIC também é aferido pelo controle de qualidade analítica do Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS), da Inglaterra.			
Metodologia Utilizada			
LC-MS/MS			
Limite de Detecção			
Ác. Penicílico (20 µg/kg); Citrinina (10 µg/kg); Patulina (50 µg/kg).			

Figura 53: Recorte do laudo com o resultado na análise de presença de micotoxinas no extrato do pigmento produzido por *P. mallochii*.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidas por espécies de fungos, que podem atuar diretamente na proteção dos fungos que as produzem contra fatores ambientais e bióticos adversos (FRISVAD et al., 2005; ABUNHOSA, 2008). As micotoxinas são compostos de baixo peso molecular, sendo alguns desses compostos potenciais agentes nefrotóxicos e carcinogênicos a humanos e a outros animais (HOELTZ et al., 2009). São produzidas a partir das vias metabólicas dos policetídeos, dos terpenóides e de alguns processos que usam aminoácidos essenciais. A estrutura das micotoxinas variam desde um anel heterocíclico até oito anéis associados, o que está relacionado com a diversidade de efeitos tóxicos



(ABRUNHOSA, 2008; ABRUNHOSA et al., 2010). As micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium* apresentam caráter maléfico aos homens e outros animais, como aquelas que são encontradas como contaminantes de produtos agrícolas, tais como milho, soja, uva, damasco, maçã, pêsego e em produtos industrializados derivados de frutas (FRISVAD et al., 2004; ZHOU et al., 2010). Dentre as micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium*, algumas podem ser utilizadas na caracterização e identificação dessas espécies, estão entre elas a patulina, a citrinina e o ácido penicílico.

A citrinina é um policetídeo, com peso molecular de 250,25 Da e fórmula empírica  $C_{13}H_{14}O_5$ , que apresenta ação nefrotóxica. Citrinina foi primeiramente isolada a partir de metabólitos secundários de *Penicillium citrinum*, (HETHERINGTON e RAINSTRICK 1931, citados por SILVA 2013). Posteriormente, outras espécies de *Penicillium* (*Penicillium expansum* e *Penicillium viridicatum*) e até mesmo de *Aspergillus* (*Aspergillus niveus* e *Aspergillus terreus*) mostraram-se também capazes de produzir essa substância. Certos isolados de *Penicillium camemberti*, utilizados na produção de queijo, e *Aspergillus oryzae*, empregados na produção de alimentos asiáticos, tais como o sakê, o miso e o molho de soja, podem igualmente produzir a citrinina. Mais recentemente, a citrinina foi isolada a partir de metabólitos dos fungos *Monascus ruber* e *Monascus purpureus*, espécies industrialmente usadas para a produção de pigmentos vermelhos (MANABE, 2001; BLANE et al., 1995). A produção de citrinina é um dos problemas da liberação do uso do pigmento de *Monascus* em alguns países, pois ocorre a co-produção, por exemplo, apesar do seu uso bem-sucedido de pigmentos *Monascus* na Ásia, não são permitidos tanto na União Europeia e nem nos Estados Unidos, principalmente devido ao risco de coprodução dessa toxina.

A patulina é um composto termo resistente e tolerante a condições ácidas. Pertencente à classe hidroxifuropiranona, também conhecida como clavicina, claviformina ou expansina, apresenta fórmula empírica  $C_7H_6O_4$ , cujo peso molecular é de 154,12 Da. Trata-se de um metabólito secundário produzido por espécies de *Aspergillus*, *Bissochlamys* e *Penicillium*, sendo *P. expansum* a espécie mais estudada quanto à produção desta micotoxina (CELLI et al., 2009). Durante a década de 50 foi comprovado que a patulina, além de apresentar atividade antimicrobiana, antiviral e antiprotozoária, também era tóxica a plantas e animais,

sendo classificada em 1960 como micotoxina. Atualmente, *P. expansum*, que causa podridão em maçã, pêra, cereja e outras frutas, é o principal produtor de patulina, sendo responsável por cerca de 70 a 80% da deterioração de frutas armazenadas, em especial maçã (LEGGOTT & SHEPHARD, 2001). A Organização Mundial de Saúde recomenda um nível máximo aceitável de 50 µg/L de patulina em suco de maçã (FAO, 1997). A União Européia adotou este mesmo limite e também 25 µg/L em produtos sólidos incluindo compota e purê de maçã. Além disso, o limite máximo de 10 é proposto para produtos de maçã destinados às crianças (THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2006). Em ratos a patulina apresentou propriedades mutagênicas, teratogênica e carcinogênica, afetando os órgãos com maior suprimento sanguíneo, a exemplo do cérebro, fígado e rins (BENETT & KLICH, 2003). Mas, segundo PUEL *et al.* (2010), o IARC classifica a patulina no grupo 3 como “ não classificada como carcinogênica para humanos”. Isto ocorre devido a inexistência de pesquisas com a patulina cujo acompanhamento seja prolongado e ampliado para vários animais e tecidos. Ao nível celular, a patulina tem mostrado efeitos que incluem rompimento da membrana de células plasmáticas e inibição da síntese de DNA, mas apresentou resultados negativos no teste de genotoxicidade de Ames (PUEL *et al.*, 2010). Segundo Arafat & Musa (1995), patulina inibe o crescimento e a síntese de proteína em cultura de tecido hepático e isso se deve ao bloqueio da captação dos aminoácidos por meio da membrana e também à sua incorporação na proteína.

O ácido penicílico tem propriedades biológicas semelhantes a patulina. Produzido por algumas espécies de *Penicillium*, como *P. puberulum* e *P. cyclopium*, mas principalmente pelo fungo *Aspergillus ochraceus*. Tem atividade antibacteriana. É considerado uma micotoxina carcinogênica. Testes em camundongos machos confirmaram essa capacidade (CHAN *et al.*, 1984).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os corantes sintéticos não são considerados seguros a saúde humana e podem ser precursores de danos ambientais, o que torna premente estudos de bioprospecção de pigmentos naturais. Nesse contexto, onde os pigmentos extraídos de fungos aparecem como uma alternativa promissora em relação aos demais corantes naturais, por não apresentarem problemas de sazonalidade e pela forma de produção, que pode ser otimizada e controlada. Este trabalho buscou apresentar novas possibilidades de pigmentos fúngicos, com características importantes para a aplicação em diversas atividades industriais e biotecnologia.

Dois isolados fúngicos produtores de pigmentos, amarelo e vermelho, foram selecionados e identificados, a taxonomia é essencial para verificar o quanto o fungo é considerado seguro, se não é patógeno, e se tem perfil de metabólitos já descrito. Os isolados EARIM3A, e EARIM9A, foram identificados como *P. mallochii* e *P. cairnesense* respectivamente. O gênero *Penicillium*, possui espécies já bastante usadas em processos biotecnológicos. Estes isolados, descritos neste trabalho, não crescem a 37 °C, e não foram encontrados relatos na literatura dessas espécies relacionadas com patogenicidade ou toxicidade. Em relação a produção de micotoxinas, como já mostrado, ainda não foram descritas micotoxinas produzidas por *P. mallochii*, e este isolado faz parte da seção Esclerotiora, na qual não tem histórico de espécies que produzam toxinas. Já a espécie *P. cairnesense*, faz parte da seção Citrina, que possui várias espécies produtoras de micotoxinas, e além disso, já foi relatado a produção da citreoviridina por essa espécie.

Além da questão da segurança, outros fatores também são importantes para a utilização do pigmento na indústria: produção, custo e estabilidade da cor. Tanto o pigmento amarelo, quanto o vermelho mostraram serem estáveis a alterações na temperatura e na exposição a luz UV, o que significa um resultado bastante promissor. Em relação a variação de pH, o pigmento amarelo mostrou-se estável em pH ácido ao básico, apresentando apenas pequenas variações. Já o pigmento vermelho mudou para a cor amarela em pH 3 e 2, mostrando instabilidade.

No que tange a produção, após realização do planejamento experimental, foi obtido uma excelente produção de 4,71 g/L de pigmento amarelo. Em trabalhos futuros, essa condição de produção será validada. Além disso, outras fontes de

carbono também serão testadas a fim de diminuir o custo de produção. Resíduos agroindustriais da região serão testados como fonte direta e suplementar de carbono, como resíduos do sisal, farinha de penas e manipueira. Nesse trabalho a otimização da produção foi realizada com o isolado de *P. mallochii* que produz o pigmento amarelo, contudo, começaremos a trabalhar na otimização da produção do pigmento vermelho, que se mostrou bastante solúvel em meio aquoso e, portanto, de interesse industrial.

A análise química do extrato com o pigmento é muito importante para a identificação da molécula e sua classe química e assim estudar seu potencial de aplicação e riscos. Esta etapa vem sendo desenvolvida, buscando a elucidação da estrutura química das moléculas de interesse utilizando técnicas de espectroscopia.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABEROUMAND, A. A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences** 6, 1:71-78, 2011.
- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.R.M., VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. **Toxins** 2, 1078-1099, 2010.
- ABRUNHOSA, L.J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.
- AISHWARYA, A. D. Extraction of natural dyes from fungus: an alternative for textile dyeing. **Journal of Natural Sciences Research** 4:1-6, 2014.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARAFAT, W.; MUSA, M.N. Patulin-induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture. **Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology** 87:177-186. 1995.
- ATALLA, M. M.; ELKHRISY, E. A. M.; ASEM, M. A. Production of textile reddish brown dyes by fungi. **Malaysian Journal Microbiology** 7:33-40, 2011.
- AKILANDESWARI, P.; PRADEEP, B. V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. **Applied Microbiology Biotechnology** 100:1631-1643, 2016.
- BABULA, P.; ADAM, V.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones: occurrence, pharmacological properties and analysis. **Current Pharma Analysis** 5:47-68, 2009.
- BABITHA, S.; CARVAHLO, J.C.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid state fermentation. **World Journal Microbiology Biotechnology** 24:2671-2675, 2008.
- BENNET, J.W. & KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical of Microbiology Review** 16: 497-516. 2003.
- BLANC, P. J.; LORET, M. O.; SANTERRE, A. L.; PAREILLEUX, A.; PROMÉ, D.; PROMÉ, J. C.; LAUSSAC, J. C.; GOMA, G. Pigments of *Monascus*. **Journal Food Science**, 59:862-865, 1994.
- BOONYAPRANAI, K.; TUNGPRADIT, R.; HIEOCHAIPHANT, S. Optimization of submerged culture for the production of naphthoquinones pigment by *Fusarium verticillioides*. **Chiang Mai Journal of Science** 35:457-466, 2008.

CARO, Y.; ANAMALE, L.; FOUILLAUD, M.; LAURENT, P.; PETIT, T.; DUFOSSE, L. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. **Natural Products Bioprospecting** 2:174–193, 2012.

CARVALHO, J.C.; OISHI, A.; PANDEY; SOCCOL, C.R. Biopigments from *Monascus*: Strain selection, citrinin production and color stability. **Brazilian Archives of Biology and technology**, 48: 885-894, 2005.

CELLI, M.G., COELHO, A.R., WOSIACKI, G., BOSCOLO, M., CRUZ, C.H.G. Patulin determination in apples with rotten areas. **World Mycotoxin Journal** 2 (3): 279-283, 2009.

CHAN, P. K.; HAYES, A. W.; SIRAJ, M. Y.; MEYDRECK, E. F. Pharmacokinetics of the mycotoxin penicillic acid in male mice: absorption, distribution, excretion, and kinetics. **Toxicological Applied Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 195-203, 1984.

CHATTERJEE, S.; MAITY, S.; CHATTOPADHYAY, P.; SARKAR, A.; LASKAR, S.; KUMAR SEM, S. Characterization of Red Pigment from *Monascus* in Submerged Culture Red Pigment from *Monascus Purpureus*. **Journal of Applied Sciences Research**, 5(12): 2102-2108, 2009

CHO, Y. J.; HWANG, H. J.; KIM, S. W.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. **Journal of Biotechnology**, 95:13-23, 2002.

CHANDER, M.; ARORA, D. S. Evaluation of some White-rot fungi for their potential to descolourise industrial dyes. **Dyes and pigments**, 72: 192-198, 2007.

CHIDANANDA, C.; SATTUR, A. P. Sclerotiorin, a novel inhibitor of lipoxygenase from *Penicillium frequentans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55:2879–2883, 2007.

CHITALE, A.; JADHAV, D.V.; WAGHMARE, S.R.; SAHOO, A. K.; RANVEER, R. C. Production and characterization of brown colored pigment from *Trichoderma viride*. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, 11:529–537, 2012.

CLYDESDALE, F.M. Color as a factor in food choice, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n 1, p. 83-101, 1993.

COUTO, S.R. Dye removal by immobilized fungi. **Biotechnology Advances**, 27: 227-235, 2009.

CROMEX. **Os bastidores da cor**. São Paulo, 2001. Disponível em: <[www.cromex.com.br/cromex\\_os\\_bastidores\\_da\\_cor.pdf](http://www.cromex.com.br/cromex_os_bastidores_da_cor.pdf)>. Acesso em: 14 de set. 2016.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**, 35, 5-22, 2000.

DUFOSSE, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N.C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganism and microalgae as source of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. **Trends in Food Science & Technology**, 16:389–406, 2005

DUFOSSE, L. Microbial production of food grade pigments. **Food Technology and Biotechnology** 44:313–321, 2006.

FABRE, C. E.; SANTERRE, A. L.; LORET, M. O.; BABERIAN, R.; PAREILLEUX, A.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. **Journal Food Science**, 58, 1099-1102/1110, 1993.

FAO. **Worldwide regulations for micotoxins in food and in feed in 2003**. (FAO. Food and Nutrition Paper, 81). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm>>. Acesso em: 1 fev. 2015.

FRANCIS, F. J. A new group of food colorants. **Trends in food Science & Technology**, 3, 27-30, 1992.

FRICK, D. The coloration of food. **Review Prog. Color**, 33, 15-32, 2003.

FRISVAD, J. C.; MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Production of *Monascus* like pigment. **Technical University Denmark**, 2012.

FRISVAD, J.C., SMEDSGAARD, J., LARSEN, T.O., SAMSON, R.A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus. **Studies in Mycology** 49: 201-242, 2004.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Mycotoxin production by common filamentous fungi. In **Introduction to food and airborne fungi**. SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. (eds.), 7th ed. Centraal bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, pp. 321-330, 2002.

FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O.; SAMSON, R. A.; STOLK, A. C. Chemotaxonomy of the genus *Talaromyces*. **Anton van Leeuwenhoek**, 7:179-189, 1990.

FRISVAD, J. C. The connection between the *Penicillia* and *Aspergilli* and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 18:452-467, 1989.

GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Fungal anthraquinones. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 49:85–99, 2013.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GUARATINI, C. C. I. E ZANONI, M. V. B. Corantes Texteis. **Quimica Nova**, 23, 1:71-78, 2000.

GUNASEKARAN, S.; POORNIAMMAL, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp under submerged fermentation. **African Journal Biotechnology**, 7:1894–1898, 2008.

GUPTA, C.; SHARMA D.; AGGARWAL, S.; NAGPAL, N. Pigment production from *Trichoderma* sp. for dyeing of silk and wool. **International Journal of Science & Nature**, 4: 351–355, 2013.

HARI, R. K.; PATEL, T. R. E MARTIN, A. M. An Overview of pigment production in biológica systems: function, biosynthesis, and applicaion in food industry. **Food Reviews International**, 10, 1:49-70, 1994.

HOELTZ, M., FAGUNDES, C.A., ALCAYAGA, E.A.L., NOLL, I.B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento **Ciência Rural** 39 (3) 803-808, 2009.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. **Studies in Mycology**, 70: 53–138. 2011.

HOUBRAKEN, J.A.M.P.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity** 44: 117–133, 2010.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics** 17: 754–755, 2001.

JUNG, H.; KIM, C.; SHIN, C. S. Enhanced photostability of *Monascus* pigments derived with various amino acids via fermentation. **J. Agric. Food Chem.** 2005, 53, 7108–7114.

JUNG, H., C. KIM, K. KIM, C.S. SHIN, 2003. Color characteristics of *Monascus* pigments derived fermentation with various amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 1302-1306.

JUZLOVA, P.; MARTINKOVA, K.V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 16:163–170, 1996.

KAKHIA, T. I. **DYES, COLORS & PIGMENTS**. Disponível em: <[http://tarek.kakhia.org/books\\_eng/Dyes\\_Colors\\_Pigments.Tarek\\_Kakhia.pdf](http://tarek.kakhia.org/books_eng/Dyes_Colors_Pigments.Tarek_Kakhia.pdf)>. Acessado em 20 de agosto de 2016.

KAMALA, T.; INDIRADEVI, S.; CHANDRADEV; SHARMA, K.; KENNEDY, K. Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. From Indian region of Indo-Burma biodiversity hot spot region with special reference to Manipur. **BioMed Research International**, 1–21, 2015.



KIM, S.-J.; RHIM, J.W.; KANG, S.-G.; JUNG, S.-T. Characteristics and stability of pigments produced by *Monascus anka* in a jar fermenter. **J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.** 1997, 26, 60-66.

LEE, B.K.; PARK N.H.; PIAO H.Y.; CHUNG, W.J. Production of red pigments by *Monascus purpureus* in submerged culture. **Biotechnol Bioprocess Eng**, 6:341–346, 2001.

LEGGOTT, N.L. & SHEPHARD, G.S. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control** 12:73–76. 2001.

LOPES, F. C. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do sul. 130p, 2011.

LOPES, F.C.; TICHOTA, D.M.; PEREIRA, J.Q.; SEGALIN, J.; RIOS, A.O.; BRANDELLI, A. Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an ecofriendly alternative. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 171:616–625, 2013.

LUCAS, E. M. F.; MONTEIRODECASTRO, M. C.; TAKASHI, J. A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian Cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* van beyma. **Brazilian Journal Microbiol** 38:785–789, 2007.

LUCAS, E. M. F.; MACHADO, Y.; FERREIRA, A. A.; DOLABELLA, L. M. P.; TAKAHASHI, J. A. Improved production of pharmacologically-active sclerotiorin by *Penicillium sclerotiorum*. **Tropical J Pharma Res**, 9: 365–371, 2010.

MALDONADO, M. C.; IBARRA, L. V. Organic dyes from fungi and lichens. In **Biodiversity of fungi their role in human life**. Deshmukh, S. K.; Rai, M. K.; Ed. Oxford & publishing Co. Pvt. Ltd, New delh, India, pp 375-407, 2005.

MANABE, M. Fermented foods and mycotoxins. **Mycotoxins**, v. 51, p. 25-28, 2001.

MAPARI, S. A. S.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S. E THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, 16, 231–238, 2005.

MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. **J Agric Food Chem** 54:7027–7035, 2006.

MAPARI, S. A. S. **Chemotaxonomic Exploration of Fungal Biodiversity for Polyketide Natural Food Colorants... Discovery & evaluation of cell factories, and characterization of pigments**. 2009. 152 p. Tese (Ph.D. Thesis) Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, 2009.

MAPARI, S. A. S.; HANSEN, M. E.; MEYER, A. S. E THRANE, U. Computerized for Novel Producers of *Monascus*-like Food Pigments in *Penicillium* Species. **J. Agric. Food Chem.**, 56, 9981–9989, 2008.

MAPARI, S. A. S.; THRANE; U.; MEYER, A. Fungal polyketide azaphilone pigmentes as future natural food colorants. **Trends Biotechnology**. 28 6: 300-307, 2010.

MAPARI, S. A. S.; STRUNGE MEYER, A.; THRANE, U.; FRISVAD, J. Production of *Monascus* - like pigments. 2012 PCT/EP Patent WO2012/022765 A1.

MARTINKOVA, L.; JUZLOVA, P.; VESELY, D. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. **J Appl Bacteriol**, 79:609–616, 1995.

MENDA, M. **Corantes e pigmentos.** (2011) Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/quimicaviva\\_corantespigmentos](http://www.crq4.org.br/quimicaviva_corantespigmentos)>. Acessado em 04 de setembro de 2016.

MENDEZ, A.; PEREZ, C.; MONTAEZ, J. C.; Martinez, G.; Aguilar, C. N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, 12:961–968, 2011.

MENDONÇA, J. N. **Identificação e Isolamento de Corantes Naturais produzidos por Actinobactérias.** 2011. 121 p. Dissertação (Mestrado em química) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2011.

MICETICH, R. G.; MACDONALD, J. C. Biosynthesis of neoaspergillic and neohydroxyaspergillic acids. **J Biol Chem** 240:1692–1695, 1965.

MOHARRAM, A. M.; EMAN, M. M.; ISMAIL, M. A. Chemical profile of *Monascus ruber* strains. **Food Technol Biotechnol** 50:490–499, 2012.

MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. **Pure Appl. Chem.**, 78, 1477-1491, 2006.

MOSTAFA, M. E.; ABBADY, M. S. Secondary metabolites and bioactivity of the *Monascus* pigments review article. **Global J Biotechnol Biochem** 9:1–13, 2014.

MUKHERJEE, P. K., KENERLEY, C. M. Regulation of morphogenesis and biocontrol properties in *Trichoderma virens* by a velvet protein, *vel1*. **Appl Environ Microbiol** 76:2345–2352, 2010.

PINHEIRO, A. N. **A Química dos Pigmentos?** Disponível em: <<http://gpquae.iqm.unicamp.br/textos/T10.pdf>>. Acessado em 20 de agosto de 2016.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Database; CID=8058. Disponível em : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8058>. Acessado em 13 de março de 2017.

NAGIA, F. A.; EL-MOHAMEDY, R.S.R. Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. *Dyes and Pigments*, 75:550-555, 2007.

NEETHU, K.; RUBEENA, M.; SAJITH, S.; SREEDEVI, S.; PRIJI, P.; UNNIKN; SARATHJOSHK; JISHA, V. N.; PRADEEP, S.; BENJAMIN, S. A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities. **Advances in Biosci Biotechnol** 3:1160–1166, 2012.

NISHIDA, S. M.; OLIVEIRA, F. A. K. de; TROLL, J. **Como vemos o mundo? As propriedades da luz.** Disponível em: <[http://www2.ibb.unesp.br/Museu\\_Escola/2\\_qualidade\\_vida\\_humana/Museu2\\_qualidade\\_corpo\\_sensorial\\_visao3.htm](http://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/2_qualidade_vida_humana/Museu2_qualidade_corpo_sensorial_visao3.htm)> Acessado em: 29 de agosto de 2016.

OGIHARA, J.; KATO, J.; OISHI, K.; FUJIMOTO, Y.; EGUCHI, T. Production and structural analysis of PP-V, a homologue of monascorubramine, produced by a new isolate of *Penicillium* sp. **J Biosci Bioeng**, 90:549–554, 2000.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alim. Nutr.** Araraquara, v.14, n.2, p. 237-250, 2003

PINTEA, A. M. Synthetic Colorants. In Socaciu, C. (ed.) **Food colorants: chemical and functional properties.** CRCpress, 603-616, 2007.

PUEL, O., GALTIER, P. & OSWALD, I. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins** 2:613–631. 2010.

QUEIJA, C.; QUEIRÓS, M. A.; RODRIGUES, L. M. A cor dos Alimentos. **Química - Bol. Soc. Portuguesa Quím.** v. 80, p. 6-11, 2001.

RAY A. C.; EAKIN, R. E. Studies on the biosynthesis of Aspergillin by *Aspergillus niger*. **Appl Microbiol** 30:909–915, 1975.

RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19: 1572–1574, 2003.

RIVERA KG, DÍAZ J, CHAVARRÍA-DÍAZ F, GARCIA, M.; URB, M.; R. GREG THORN, R. G.; LOUIS-SEIZE, G.; JANZEN, D. H.; SEIFERT, K. A. *Penicillium mallochii* and *P. guanacastense*, two new species isolated from Costa Rican caterpillars. **Mycotaxon** 119: 315–328, 2012.

RIVERA, K.G.; SEIFERT, K.A. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. **Studies in Mycology** 70: 139–158, 2011.

ROQUE, M. R. A.; HORA JÚNIOR, B. T. da; OLIVEIRA, B. M. Potencial biotecnológico de fungos do semi-árido. In: Luís Fernando Pascholati Gusmão; Leonor Costa Maia (Org.). **Diversidade e caracterização dos fungos do semi-árido.** 1ed.Recife-PE: Associação Plantas do Nordeste (APNE), v. 2, p. 203-219, 2006.

SAGARAM, U.S.; KOLOMIETS, M.; SHIM, W. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticilloides* - maize system. **Plant Pathol J**, 22:203–210, 2006.

SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A.; SOUZA, J.; CHAVERRI, P. *Trichoderma stromaticum* and its overseas relatives. **Mycol Progress**, 2011.

SANTOS-EBINUMA, V. C.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, M. F. S., PASSO; A. J. R. A. Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of diferente parameters in their stability. **Biotechnol Prog** 29:778–785.

SASIDHARAN, P.; RAJA, R.; KARTHIK, C.; SHARMA, R.; INDRA ARULSELVI, P. Isolation and characterization of yellow pigment producing *Exiguobacterium* sp. **J Biochem Tech** 4:632–635, 2013.

SARDARYAN E: Strain of the microorganism *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* and its application. 2002 US **Patent** 6,340,586 B1.

SARDARYAN E: Food supplement. 2004 US **Patent** 0105864 A1.

SARON, C.; FELISBERTI, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilidade de polímeros. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 124-126, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422006000100022](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100022)>. Acesso em: 02 setembro, 2016.

SHARMA, D.; GUPTA, C.; AGGARWAL, S.; NAGPAL, N. Pigment extraction from fungus for textile dyeing. **Indian J Fiber Textile Res** 37:68–73, 2012.

SILVA, L. R. C. **Espécies de *Penicillium* em solos de caatinga e mata atlântica, produção de tanase e detecção do potencial micotoxigênico**. 2013. 202 p. Tese, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2013.

SPEARS, K. Developments in food colourings: the natural alternatives. **Trends in Biotechnology**, 6, 283-288, 1988.

STICH, E.; CHAUNDRY, Y.; SCHNITTER, C. Colour, you eat with your eyes, **Int. Food Ingred.** 1 (2002) 6–8.

TAKAHASHI, J. A.; CARVALHO, S. A. Nutritional potential of biomass metabolites from filamentous fungi. **Curr Res Edu Topics Appl Microbiol Microbial Biotechnol**, 1126–1135, 2010.

TEIXERIA, M. F. S.; MARTINS, M. S.; SILVA, J. C. D.; KIRSCH, L. S.; FERNANDES, O. C.; CARNEIROL, A. L. B.; CONTI, R. D.; DURANN. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium* characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends Biotechnol Pharmacy** 6:300–311, 2012.

TENG, S. S.; FELDHEIM, W. Analysis of anka pigments by liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, 47, 529–536, 1998.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission regulation (EC) no. 1881/2006–303–L364/17. **Official Journal European Union**. pp.13–14, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **A natureza da luz**. Disponível em: <<http://www.if.ufrgs.br/oei/stars/espectro.htm>>. Acessado em: 01 de setembro de 2016.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J. E DI LUCCIO, M. Producao de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Quim. Nova**, 32, 9:2429-2436, 2009.

VÁZQUEZ-DUHALT, R. **Biological Thermodynamics**. AGT Editor, SA, Mexico DF, p.223, 2002.

VELOSO, L. A. **Corantes e Pigmentos**. 2012. 38 p. Dossiê Técnico, Instituto de Tecnologia do Paraná, Paraná, 2012.

VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, 78, pp. 343–371, 2014.

YANG, T.; LIU, J.; LUO, F.; LIN, Q.; ROSOL, T. J. Anticancer properties of *Monascus* metabolites. **Anti-Cancer Drugs** 25:735–744, 2014.

WANG, Y.; JU, X.; ZHOU, Y. The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. **Food Microbiol**, 22:145-148, 2005.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego, 1990.

ZHANG, Y. Q.; BROCK, M.; KELLER, N. P. Connection of propionyl-CoA metabolism to polyketide biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. **Genet** 168:785–794, 2004.

ZARKOGIANNI, M.; MIKROPOULOU, E.; VARELLA, E. E TSATSARONI, E. Colour and fastness of natural dyes: revival of traditional dyeing techniques. **Color. Technol.**, 127, 18-27, 2010

ZOLLINGER, H. Analysis, ecology, and toxicology of colorants. In **Color chemistry - Syntheses, properties, and application of organic dyes and pigments**, third revised edition, VHCA, Zurich, Switzerland and WILEY-VCH, Weinheim, Germany, pp586-590, 2003.

ZHOU, S., JIANG, L., GENG, C., CAO, J., ZHONG, L. Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. **Toxicol** 55: 390–395, 2010.

## 7. ANEXOS

### 7.1 Laudo técnico presença/ausência de micotoxinas



LAMIC - Laboratório de Análises Microbiológicas -  
CCR & CCS DMVP & BACT FATEC  
Coordenação: Prof. C. A. Mallmann  
Prédio 44, 3º andar, ala norte  
Santa Maria - RS, CEP - 97.105-900  
Fones: (55) 3228.8445 / 8073 - Cel: (55) 9961.4377  
www.lamic.ufes.br

Santa Maria 15 de dezembro de 2016.

#### Relatório de Análise

Identificação	
Requisitante:	Patrícia Oliveira - Instituto Federal Baiano
Responsável:	Patrícia Oliveira
E-mail:	patriciaoliveirabiologia@gmail.com
Endereço:	Rua da Embraço, número 486, Bairro Chapadinha, CEP: 44380 - 000
Cidade/Estado:	Cruz das Almas - BA
Fone/Fax:	(71) 992101355
Observação da Solicitação:	
Observação Amostra:	

Código: 5P/2016

Data/Hora Entrada:	10/12/2016 15:30
Data/Hora Saída:	15/12/2016 16:00

Amostra: 05P/16	Extrato, EARIM3A, Data Coleta set/16.
-----------------	---------------------------------------

RESULTADOS µg/kg (ppb)		
Ác. Penicílico	Patulina	Citrinina
<LD	<LD	<LD

#### Informação

O LAMIC também é aferido pelo controle de qualidade analítica do Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS), da Inglaterra

#### Metodologia Utilizada

LC-MS/MS

#### Limite de Detecção

Ác. Penicílico (20 µg/kg); Citrinina (10 µg/kg); Patulina (50 µg/kg).

A responsabilidade do plano e procedimento de amostragem é do cliente. Os resultados restringem-se tão somente à amostra analisada. Este certificado não poderá ser reproduzido parcialmente. Testes adicionais disponíveis para esta amostra: [www.lamic.ufes.br](http://www.lamic.ufes.br)

  
Carlos Alberto Araújo de Almeida  
Responsável Técnico - CRF/RS 4332  
LAMIC

  
Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann  
COORDENADOR  
Laboratório de Análises Microbiológicas



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**Número do Processo:** BR 10 2016 019135 1

**Dados do Depositante (71)**

---

**Depositante 1 de 3**

**Nome ou Razão Social:** Universidade Federal da Bahia

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 15180714000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua Augusto Viana s/n,

**Cidade:** Salvador

**Estado:** BA

**CEP:** 40-110060

**País:** Brasil

**Telefone:** (71)3263 7000

**Fax:** (71)3263 7027

**Email:** npi@ufba.br

**Depositante 2 de 3**

**Nome ou Razão Social:** INSTITUTO FEDERAL BAIANO

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 10724903000179

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua do Rouxinol, nº 115 – Bairro: Imbuí

**Cidade:** Salvador

**Estado:** BA

**CEP:** 41720-052

**País:** BRASIL

**Telefone:** (71) 318 60001

**Fax:**

**Email:** propes@ifbaiano.edu.br

**Depositante 3 de 3**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 07777800000162

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua Rui Barbosa, 710 - Centro

**Cidade:** Cruz das Almas

**Estado:** BA

**CEP:** 44380-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (75) 362 12350

**Fax:**

**Email:** cinova@ppgci.ufrb.edu.br



## Dados do Pedido

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** "MÉTODO DE PRODUÇÃO DE PIGMENTO FÚNGICO AMARELO"

**Resumo:** A presente invenção conjuga o método para a produção e extração de pigmento natural amarelo estável a partir do cultivo da linhagem fúngica *P. mallochii*, para fins de utilização deste pigmento como agente colorante em alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos, papel, têxtil, plásticos e polímeros. A produção ótima do pigmento ocorre com o cultivo da linhagem de *P. mallochii* em meio líquido batata e dextrose, com o pH 3,6, rotação de 0 a 36 rpm e temperatura de 24 °C por 7 dias. A extração é realizada adicionando o solvente hexano ao micélio, depois retirando a solução, filtrando e evaporando o solvente. O extrato com o pigmento obtido foi submetido a testes para verificar a estabilidade da cor a alterações de temperatura e exposição à radiação, que mostraram que não ocorreram alterações significativas na cor depois de processos de autoclavagem, fervura, congelamento e exposição a luz UV.

**Figura a publicar:** 2

## Dados do Inventor (72)

---

### Inventor 1 de 7

**Nome:** PATRÍCIA OLIVEIRA DOS SANTOS

**CPF:** 01934625590

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** Rua da Embrapa, nº 486, Chapadinha

**Cidade:** Cruz das Almas

**Estado:** BA

**CEP:** 44380-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (71) 921 01355

**Fax:**

**Email:** patriciaoliveirabiologa@gmail.com

### Inventor 2 de 7

**Nome:** MILTON RICARDO DE ABREU ROQUE

**CPF:** 07981736889

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Avenida Anita Garibaldi, 1901 apto 101 - Federação

**Cidade:** Salvador

**Estado:** BA

**CEP:** 40210-750

**País:** BRASIL

**Telefone:** (71) 999 190125

**Fax:**

**Email:** milton.roque@gmail.com

### Inventor 3 de 7

**Nome:** JORGE TEODORO DE SOUZA

**CPF:** 50166786187

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Agrônomo e afins

**Endereço:** Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras,  
Campus Universitário

**Cidade:** Lavras

**Estado:** MG

**CEP:** 37200-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (35) 382 94527

**Fax:**

**Email:** jgeteodoro@gmail.com

**Inventor 4 de 7**

**Nome:** ANA CRISTINA FERMINO SOARES

**CPF:** 66869374520

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** Rua H, n. 216, Inocoop

**Cidade:** Cruz das Almas

**Estado:** BA

**CEP:** 44380-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (71) 981 870047

**Fax:**

**Email:** ferminosoares@gmail.com

**Inventor 5 de 7**

**Nome:** CARLOS AUGUSTO DÓREA BRAGANÇA

**CPF:** 01125891548

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Agrônomo e afins

**Endereço:** Rua B, n 17, passinhos

**Cidade:** Cruz das Almas

**Estado:** BA

**CEP:** 44380-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (75) 991 423235

**Fax:**

**Email:** carlosadbraganca@gmail.com

**Inventor 6 de 7**

**Nome:** CALINE GOMES FERRAZ

**CPF:** 61593931549

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Avenida Princesa Isabel, 630, Barra. Edifício - COURCHEVEL  
RESIDENCE Apt-101

**Cidade:** Salvador

**Estado:** BA

**CEP:** 40140-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (71) 324 71476

**Fax:**

**Email:** califerraz@gmail.com

**Inventor 7 de 7**

**Nome:** CAROLINA YAMAMOTO SANTOS MARTINS

**CPF:** 04760418644

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Agrônomo e afins

**Endereço:** Rua 9, 205, Porções

**Cidade:** Cruz das Almas

**Estado:** BA

**CEP:** 44380-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (75) 991 235531

**Fax:**

**Email:** carolyama@gmail.com

### **Documentos anexados**

---

<b>Tipo Anexo</b>	<b>Nome</b>
Relatório Descritivo	relatorio descritivo.pdf
Reivindicação	reivindicações.pdf
Desenho	figuras.pdf
Resumo	resumo.pdf
Procuração	Procuração.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante pagamento.PDF

### **Acesso ao Patrimônio Genético**

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

### **Declaração de veracidade**

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**Obrigado por acessar o Peticionamento Eletrônico**

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Este pedido foi enviado pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 18/08/2016 às 09:01