



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**LUCIANA AIRES DE OLIVEIRA**

**PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COLORANTES  
PRODUZIDOS POR FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DO SOLO  
AMAZÔNICO**

**MANAUS  
2017**

**LUCIANA AIRES DE OLIVEIRA**

**PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COLORANTES  
PRODUZIDOS POR FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DO SOLO  
AMAZÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de *mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais*.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Érica Simplício de Souza**  
**Co-Orientador: Prof Dr João Vicente Braga de Souza**

**MANAUS  
2017**

**LUCIANA AIRES DE OLIVEIRA**

**PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COLORANTES  
PRODUZIDOS POR FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DO SOLO  
AMAZÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de *mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais*.

Data da aprovação \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>.Dra. Érica Simplício de Souza

Prof<sup>a</sup>.Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque

Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

**MANAUS  
2017**

## Ficha Catalográfica

O48p Oliveira, Luciana Aires de

Produção, isolamento e identificação de colorantes produzidos por fungos isolados de amostras do solo amazônico. / Luciana Aires de Oliveira -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2017.

XI; 57 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2017.

Orientadora: Profa. Dra. Érica Simplício de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

1. Colorantes 2. Fungos 3. Caracterização química  
4. Solo Amazônico I. Título.

CDU:60:582.28(043)

***Dedicatória***

*A Deus e Nossa Senhora.*

*Aos meus pais José Moacir de Oliveira e Maria Darcy Aires de Oliveira por todo o amor, carinho e dedicação que me impulsionaram durante a trajetória para a realização de mais esse sonho.*

*Aos meus irmãos Lorena Alessandra Aires de Oliveira e Leandro José Aires de Oliveira por sempre me incentivarem em tudo que me disponho a fazer. Amo vocês!!*

*“O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela, o oceano será menor.”*

Madre Teresa de Calcutá

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre abençoar os meus planos e colocar pessoas de bom coração no meu caminho, que me impulsionaram durante a trajetória para a realização de mais essa etapa na minha vida. E a minha Mãezinha do Céu por toda sua intercessão.

Aos meus queridos orientadores Dr<sup>a</sup> Érica Simplício de Souza e Dr João Vicente Braga de Souza. Nossa, vocês são incríveis!! Obrigada por toda paciência e confiança em mim na realização deste trabalho. Obrigada por compartilharem os seus ensinamentos. Todo o meu crescimento profissional até aqui devo a vocês. Vocês são uns verdadeiros “Pais Científicos”.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (PPG-MBT/UEA) por todo o auxílio durante esses dois anos.

A família “Micomaníacos” representada por todos os alunos, colaboradores e técnicos do Laboratório de Micologia do INPA. A ótima convivência no dia-a-dia, amizade, conselhos, momentos de alegria e descontração e todo o apoio nos dias difíceis me impulsionaram a chegar até aqui. Vocês foram fundamentais na realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-INPA). Em especial, Dr<sup>a</sup> Maria da Paz Lima, Jean Lucas, Paulo Alan e Henrique por todos os ensinamentos e apoio na purificação e, por fim, na identificação da molécula.

Aos meus companheiros de Mestrado: Jéssica, Paulo Alexandre, Paulo Henrique, Paola e Gilmar. Os nossos muitos rodízios onde compartilhamos os dias de luta e principalmente os dias de glória também me incentivaram a chegar até aqui. Obrigada pela parceria e amizade de vocês!!

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!

## RESUMO

Os corantes sintéticos quando utilizados em excesso, podem causar efeitos tóxicos para a saúde, como mutagenicidade, potencial carcinogênico, hiperatividade em crianças, urticária, indisposição gástrica e vômitos. Os corantes de origem fúngica são uma alternativa aos sintéticos porque possuem potencial para apresentar menor toxicidade, maior biodegradabilidade, além de poderem possuir atividades antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas. Entretanto, poucos estudos investigaram o potencial dos fungos Amazônicos para a produção de colorantes. O presente estudo teve como objetivo produzir, isolar e identificar colorantes produzidos por fungos do solo Amazônico. Duzentos isolados fúngicos obtidos de amostras de solo Amazônico e pertencentes à Coleção de Microorganismos do INPA foram utilizados nesse estudo. Os isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de produzir colorantes. Os isolados que apresentaram os colorantes mais intensos foram conduzidos a bioprocessos submersos e identificados por sequenciamento da região ITS do rDNA. O colorante mais intenso foi submetido a metodologias de cromatografia preparativas (cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna) e o colorante isolado foi identificado por métodos espectrométricos (RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C e massas). Experimentos univariados foram realizados para avaliar a influência de diferentes fatores de bioprocessos na produção do colorante. Como principais resultados observou-se que, das 200 linhagens investigadas, 45 foram capazes de produzir colorantes. Os isolados *Penicillium sclerotiorum* LM 5679, *Penicillium* sp. LM 5903 e *Penicillium* sp. LM 5924 destacaram-se produzindo os colorantes mais intensos. A substância colorida produzida por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 foi isolada e quimicamente identificada como um alquilresorcinol (5-pentadacilresorcinol). Quanto à influência dos fatores do bioprocessos, sacarose, extrato de levedura e nitrato de sódio promoveram uma melhor produção do colorante. Diante dos resultados expostos, conclui-se que os fungos do solo Amazônico são potenciais produtores de colorantes e mais estudos sobre suas exigências nutricionais, estabilidade e toxicidade desses compostos são necessários para sua posterior inserção no mercado.

**Palavras chaves:** Colorantes, caracterização química, fatores de bioprocessos, solo Amazônico.



## ABSTRACT

Synthetic dyes when used in over, may cause some toxic effects to health, such as mutagenicity, carcinogenic potential, hyperactivity in children, urticaria, stomach ache and vomit. Fungal dyes are an alternative to synthetic ones because they have the potential to present lower toxicity, greater biodegradability, besides being able to possess antimicrobial, antioxidant and anticancer activities. However, few studies have investigated the potential of the Amazonian fungi for dye production. The purpose of the present study were to produce, isolate and identify dyes produced by fungi from Amazonian soil. Two hundred fungal isolates obtained from samples of Amazonian soil and belonging to the Collection of Microorganisms of INPA were used in this study. The isolates were evaluated for their ability to produce dyes. The isolates that showed the most intense dyes were submitted to a submerged bioprocess and identified by sequencing of the ribosomal DNA ITS region. The most intense colorant produced by one of the fungi tested in these bioprocesses was subjected to preparative chromatography (thin-layer chromatography and column chromatography) and the isolated dye was identified by spectrophotometric methods ( $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$ ) and mass spectroscopy. Univariate experiments were performed to evaluate the influence of different bioprocess factors on dye production. As main results, we observed that of the 200 strain investigated, 45 were able to produce dyes. The strains *Penicillium sclerotiorum* LM 5679, *Penicillium* sp. LM 5903 and *Penicillium* sp. LM 5924 stood out producing the most intense dyes. The colored substance produced by *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 has been isolated and chemically identified as an alkylresorcinol (5-pentadacylresorcinol). Regarding the influence of the bioprocess factors, sucrose, yeast extract and sodium nitrate increased production the dye. In view of the above results, the fungi of the Amazonian soil are potential producers of dyes and further studies on the stability, toxicity and applicability of these compounds are necessary for their subsequent insertion in the market.

**Keywords:** Colorants, chemical characterization, bioprocess factors, Amazonian soil.

## 1 LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

Tabela 1: Dados de RMN do colorante isolado a partir de *Penicillium sclerotiorum* LM 5679. ....24

Tabela 2: Diferentes fatores utilizados na avaliação da influência das condições de bioprocessamento na produção do colorante por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 em bioprocessamento submerso. ....26

## 2 LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Estruturas químicas de azafilonas produzidas pelo gênero *Monascus*. A) Ankaflavin. B) Monascina. C) Monascorrubrina. D) Rubropunctatina. E) Rubropunctamina. (Desenhadas com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen) ..... 7

Figura 2: Estrutura química básica do Arpink Red™. (Desenhada com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen) ..... 8

Figura 3: Estrutura química da astaxantina. (Desenhada com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen) ..... 9

Figura 4: Estrutura química do licopeno. (Desenhada com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen) ..... 9

Figura 5: Estrutura química do β-caroteno. (Desenhada com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen) .....10

Figura 6: Estrutura química da riboflavina. (Desenhada com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen) .....10

### ARTIGO

Figura 1: Cores das fases orgânica e aquosa provenientes da partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades dos colorantes produzidos pelos três isolados selecionados (*Penicillium* sp. LM 5679, *Penicillium* sp. LM 5903 e *Penicillium* sp. LM 5924) em bioprocessos em meio líquido. ....21

Figura 2: Extração e fracionamento cromatográfico em coluna Sephadex LH-20 (eluente: metanol), coluna de sílica gel (eluentes: hexano, hexano:acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila:metanol e metanol) e coluna de celulose microcristalina (eluentes: hexano, hexano:acetato de etila e metanol) do colorante produzido por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679. ....23

Figura 3: Estrutura química da substância isolada (5-pentadacilresorcinol) a partir de *Penicillium sclerotiorum* LM 5679. ....25

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Colorantes .....	3
2.2 Fungos produtores de colorantes.....	4
2.3 Classes químicas dos colorantes produzidos por fungos .....	7
2.4 Influência dos fatores do bioprocessamento na produção de colorantes por fungos .....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo Geral.....	13
3.2 Objetivos Específicos .....	13
4. ARTIGO.....	14
5. CONCLUSÃO .....	33
6. REFERÊNCIAS.....	34
7. APÊNDICE .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

Os colorantes são compostos com características importantes para as indústrias alimentícia, têxtil, cosmética, de alimentos e medicamentos. Na indústria alimentar são utilizados como aditivos, intensificando a cor do produto para que a aceitabilidade pelo consumidor seja maior (MALIK et al., 2012). Porém, estas indústrias utilizam colorantes sintéticos que apresentam uso limitado porque em excesso causam alguns efeitos tóxicos para a saúde, como mutagenicidade, potencial carcinogênico, hiperatividade em crianças, urticária, indisposição gástrica e vômitos (KOBYLEWSKI e JACOBSON, 2012), além de serem de difícil biodegradabilidade, pois apresentam moléculas muito complexas, o que os torna preocupantes agentes da poluição ambiental (ALI, 2010).

A maioria dos colorantes naturais atualmente disponíveis no mercado são obtidos de fontes vegetais e animais. No entanto, estes aditivos têm inúmeros inconvenientes, tais como a instabilidade, alto custo e muitas vezes não estão disponíveis durante todo o ano (GUNASEKARAN e POORNIAMMAL, 2008).

As vantagens da produção de colorantes a partir de micro-organismos incluem a independência das condições climáticas, as cores de tons diferentes, crescimento em substratos de baixo custo, por exemplo, resíduos agroindustriais. Além da possibilidade de produção em pequenos espaços e em larga escala (LOPES et al., 2013). Os colorantes de origem fúngica também apresentam menor toxicidade, maior biodegradabilidade e podem apresentar atividades antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, entre outras (VELMURUGAN et al., 2009; OSMANOVA et al., 2010).

Poucos trabalhos foram publicados investigando os fungos amazônicos como produtores desses compostos. Porém, pode-se destacar o trabalho de Celestino et al., (2014), que, ao estudar fungos do solo Amazônico como produtores de colorantes, obtiveram colorações variando do amarelo ao vermelho. O isolado fúngico que se destacou nesse estudo foi a espécie *Penicillium sclerotiorum*. O colorante isolado neste estudo foi a esclerotiorina, que apresenta atividades biológicas muito peculiares como a inibição das enzimas aldose redutase, lipases, integrases e proteases do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 (OSMANOVA et al., 2010).

Teixeira et al., (2012) investigaram a produção de pigmentos por espécies Amazônicas do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* e também avaliaram as atividades antibacterianas e

toxicidade dos extratos produtivos. Porém, ainda faltam grandes screenings de produção destes compostos.

Devido a todos esses fatores, a descoberta de novos colorantes de origem microbiana ainda é necessária a fim de suprir os interesses das indústrias que buscam substituir os sintéticos por naturais, dos consumidores que estão cada vez mais preocupados em adquirir alimentos saudáveis, além de contribuir para a preservação da biodiversidade. E o estudo de compostos produzidos por fungos do solo Amazônico também é de grande contribuição para o conhecimento e desenvolvimento da região.

Por isso, o presente estudo teve como objetivo produzir, isolar e identificar colorantes produzidos por fungos do solo Amazônico.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Colorantes

Colorantes são substâncias artificiais ou naturais utilizadas para dar coloração durável a algum produto, realçando ou restaurando a sua aparência. São compostos com características de grande importância para as indústrias alimentícia, cosmética e têxtil. E podem ser classificados como pigmentos ou corantes. Pigmentos são insolúveis no meio aplicado e corantes são solúveis no meio (SANTOS-EBINUMA, 2013).

Na indústria alimentícia são utilizados como aditivos alimentares, intensificando a coloração do produto, pois o consumidor julga a qualidade de um produto pela sua aparência. Então, as indústrias dos diversos segmentos passaram a investir nos corantes como uma estratégia de realçar a aparência de um determinado produto visando uma maior aceitabilidade pelo consumidor (MALIK et al., 2012).

Existem evidências que o uso de colorantes começou há milhares de anos com as civilizações antigas da China, Índia e Egito. E por muitos anos foram obtidos de fontes naturais e vegetais e a comercialização desses tipos de substâncias movimentou o mercado nesse setor por muitos anos (SARON e FELISBERT, 2006; ZHANG et al., 2006; SANTOS-EBINUMA, 2013).

A partir do século XIX, a indústria de corantes mudou radicalmente e os corantes naturais foram gradualmente substituídos pelos sintéticos quando o primeiro colorante, a malveína, de coloração roxa foi sintetizado pelo inglês William Perkin em 1856 (ZHANG et al., 2006).

Os corantes naturais de fontes animais e vegetais são muito instáveis e de baixa solubilidade em água como também não estão disponíveis durante todo o ano. Já os sintéticos são produzidos para serem mais estáveis (GUNASEKARAN e POORNIAMMAL, 2008).

Os corantes sintéticos nos últimos anos vêm sofrendo muitas restrições pela legislação uma vez que seu consumo prolongado e em excesso é tóxico para os seres humanos e agente de poluição para o meio ambiente. Com isso, muitos países começaram a se adequar a essa nova realidade e passaram a limitar o uso de certos corantes sintéticos, principalmente, em alimentos (ALI, 2010; MAPARI et al., 2010; KOBYLEWSKI e JACOBSON, 2012).

Apenas nove corantes sintéticos são atualmente permitidos em alimentos nos Estados Unidos, porém este número já chegou a 700 substâncias no século XX (DOWNHAM e COLLINS, 2000). Na União Européia, apenas 17 corantes sintéticos são autorizados para

serem utilizados em alimentos e bebidas. Na Noruega e Suécia, é proibido o uso de corantes sintéticos em alimentos (REYES e PRADO, 2001). No Brasil, o controle do uso de corantes sintéticos como aditivos alimentares é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), resoluções nº 382 e 388 de 9 de agosto de 1999, e apenas 11 corantes sintéticos são permitidos (amarelo crepúsculo, amarelo tartrazina, vermelho de eritrosina, vermelho 40, amaranto, ponceau 4R, azul indigotina, azul brilhante, azul patente V, azorrubina, verde rápido) (PRADO e GODOY, 2003).

## **2.2 Fungos produtores de colorantes**

Vários organismos são capazes de sintetizar pigmentos, como plantas, animais, bactérias, algas e fungos. Mas os fungos destacam-se pela possibilidade da produção industrial de corantes naturais por meio de fermentação que pode ser feita em pequenos espaços e em larga escala (MAPARI et al., 2010).

A produção de colorantes por fermentação microbiana é de mais fácil extração, possibilita a redução dos custos de produção por meio da escolha das melhores condições de cultivo e de resíduos agroindustriais como um substrato de baixo custo. Um rendimento mais elevado também pode ser obtido por meio do melhoramento genético do isolado fúngico. E os micro-organismos não sofrem influências da variação da sazonalidade como as plantas que são uma das principais fontes de corantes naturais (MALIK et al., 2012).

Os colorantes microbianos surgem como uma alternativa para superar a crescente preocupação do uso de corantes sintéticos como aditivos alimentares, pois já são relatados os efeitos adversos causados por essas substâncias para a saúde humana. A utilização de corantes naturais também contribuiria para a preservação da biodiversidade, pois muitos produtos químicos são despejados no meio ambiente para a produção de corantes sintéticos (NAGPAL et al., 2011). O despejo deste tipo de substância na água pode interferir na penetração da luz solar, afetando a fotossíntese, na solubilidade de gases e na inibição do crescimento dos diversos organismos aquáticos (CHANDER e ARORA, 2007; COUTO, 2009).

Os fungos filamentosos apresentam várias características que despertaram o interesse para o uso biotecnológico desses micro-organismos como o crescimento em substratos simples e de baixo custo, além da produção de diversos metabólitos com diferentes atividades biológicas (MEYER 2008; LOPES et al., 2013). São conhecidos por produzir uma diversidade de colorantes. Entre os fungos que apresentam a habilidade de produzir



colorantes, destacam-se os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Monascus* (MÉNDEZ et al., 2011).

O gênero *Paecilomyces* produz colorantes em tonalidades vermelhas, amarelas e violetas. O gênero *Monascus* tem como produto um fermentado a partir do arroz, conhecido como arroz vermelho fermentado, levedura de arroz vermelho, arroz molde vermelho, arroz chinês vermelho, vermelho de koji, anka, que já vem sendo utilizado como remédio tradicional e corante alimentar por mais de 1000 anos na China (LI et al., 2010).

Espécies de *Monascus* são conhecidas por produzir colorantes amarelo (ankaflavin e monascina), laranja (rubropunctatina e monascorrubrina) e vermelho (rubropunctamina e monascorrubramina) (MORTENSEN, 2006).

Na Alemanha, França, Estados Unidos e Japão já foram emitidas 50 patentes sobre o uso de colorantes de *Monascus* na alimentação. Estes têm sido utilizados para coloração de carnes processadas como salsichas e presunto, produtos marinhos e ketchup. No Japão, o consumo anual de alimentos tendo como aditivos colorantes produzidos por espécies de *Monascus* atingiu 600 toneladas no final dos anos noventa com um rendimento de US \$ 1,5 milhões (DUFOSSÉ, 2006).

Estudos revelam a co-produção pelas espécies de *Monascus* da micotoxina citrinina, um composto tóxico para o ser humano. Porém, estudos também relatam que se este colorante for utilizado de forma correta o mesmo revela-se não-tóxico (KANG et al., 2014). Apesar do consumo há milhares de anos desse colorante alimentar pela população oriental, a sua aprovação para uso nas indústrias alimentícias da União Européia e Estados Unidos ainda não foi liberada (RENHE et al., 2006).

*Penicillium oxalicum* produz um colorante vermelho chamado Arpink red™. É fabricado pela ASCOLOR BIOTECH na República Checa. Foi isolado do solo e tem aplicação para a indústria alimentícia e cosmética, além de produzir um cromóforo do tipo antraquinona (SARDARYAN et al., 2004).

A riboflavina (vitamina B2), um corante alimentar amarelo que tem um leve odor e sabor amargo é produzida por diversos micro-organismos como *Candida guilliermondii*, *Eremothecium ashbyii* e *Ashbya gossypi*. A riboflavina pode ser utilizada em bebidas, sorvetes, molhos e outros produtos (STAHMANN et al., 2000; SANTOS et al., 2005).

Os carotenoides são comumente encontrados na natureza e apresentam coloração amarelo a vermelho-alaranjado. São amplamente utilizados em produtos alimentares, além de serem bons antioxidantes (BROWNING et al., 2003; TAKANO et al., 2005).

*Mucor circinelloides* do tipo selvagem apresenta uma coloração amarela por ser um produtor de carotenoide do tipo  $\beta$ -caroteno. Alguns estudos relatam que a biossíntese desse colorante é ativada através da luz azul a qual induz a produção de altas concentrações de colorante. Ao serem cultivadas no escuro produzem quantidades mínimas de  $\beta$ -caroteno (NAVARRO et al.,2001).

Outro micro-organismo produtor de  $\beta$ -caroteno é *Phycomyces blakesleeanus*, porém sua produção ainda é baixa, cerca de 0,05 mg. *Blakeslea trispora* é um melhor produtor de  $\beta$ -caroteno com uma produtividade que pode chegar até 30 mg/g de massa seca ou 3g/L (DUFOSSÉ, 2006; TAKAHASHI; CARVALHO, 2010). A empresa DSM foi a primeira a produzir  $\beta$ -caroteno por fermentação microbiana e lançou o produto em 1995 na “Food Ingredients”, uma reunião de negócios em Londres. Empresas da Rússia, Ucrânia e Espanha também passaram a produzir  $\beta$ -caroteno utilizando *Blakeslea trispora* (DUFOSSÉ, 2006).

Uma cepa de *Fusarium sporotrichioides* geneticamente modificada foi capaz de produzir licopeno a partir de fibra de milho, um material de baixo custo resultante da fabricação de etanol (JONES et al.,2004).

*Xanthophyllomyces dendrorhous* é um dos melhores produtores em nível industrial de astaxantina (MOHANKUMARI et al., 2009). Os animais não são capazes de sintetizar carotenoides, por isso o colorante é adicionado na dieta destes. Mas para que o colorante seja absorvido pelo intestino dos animais a parede celular da levedura precisa sofrer uma ruptura antes de ser adicionada na dieta (FANG e WANG, 2002).

Leveduras do gênero *Rhodotorula* também são capazes de sintetizar carotenoides do tipo  $\beta$ -caroteno, mas em concentrações muito baixas tendo como principais compostos produzidos tolueno e torularrodina (SAKAKI et al.,2000). Para tentar aumentar a produção de  $\beta$ -caroteno, estudos vem sendo feitos utilizando como estratégias a otimização do meio e das condições de cultivo, como também de melhoramento genético a partir de cepas selvagens (TINOI et al., 2005).

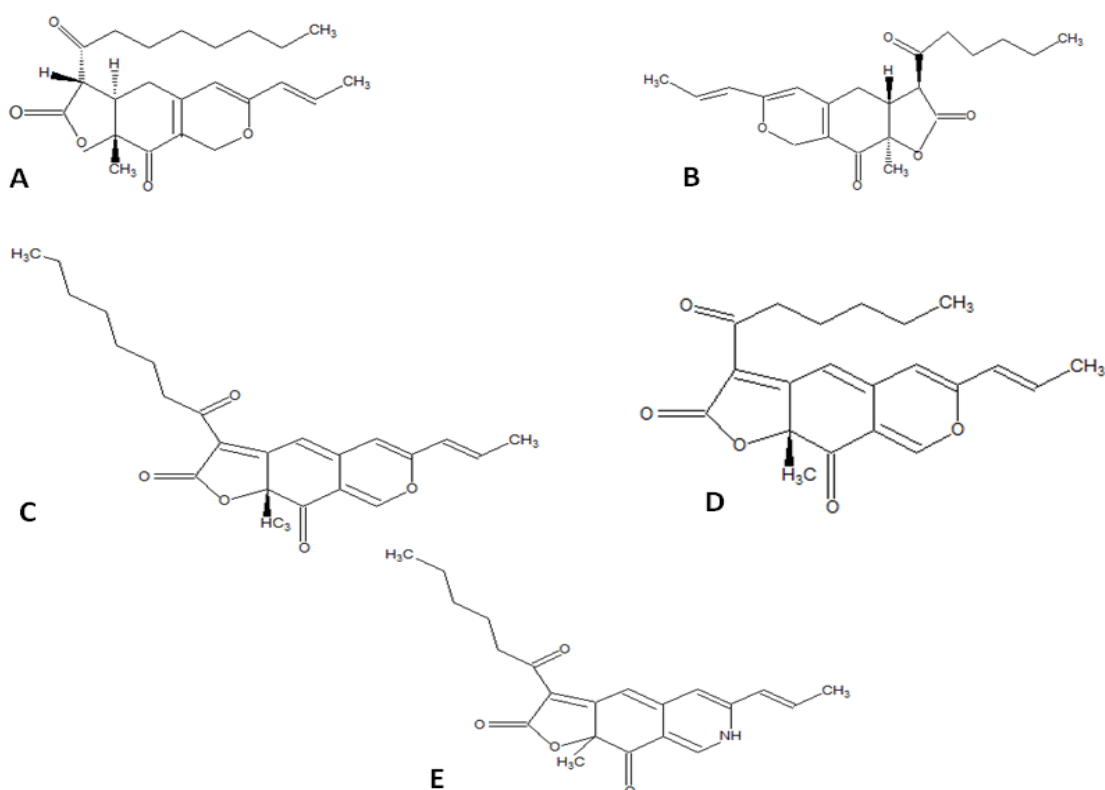
A maioria dos estudos está concentrada na espécie *Rhodotorula glutinis*, mas *R. gracilis*, *R. rubra* e *R. graminis* já começaram a ser investigadas quanto a produção de  $\beta$ -caroteno (SIMOVA et al.,2004).

### 2.3 Classes químicas dos colorantes produzidos por fungos

A cor de cada colorante está relacionada com a capacidade de suas estruturas químicas absorverem radiações eletromagnéticas na região do espectro visível (SARON e FELISBERTI, 2006). No espectro magnético visível, os comprimentos de onda maiores que 700 nm correspondem aos vermelhos e os menores (400 nm) são violetas (CARVALHO, 2004).

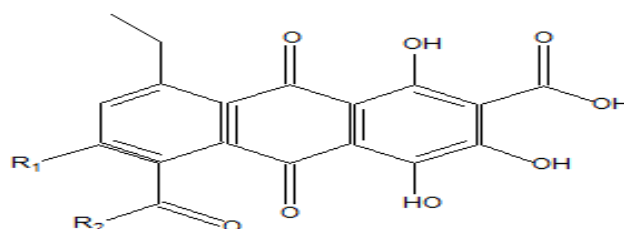
Os colorantes de origem fúngica são classificados em dois grandes grupos quanto as suas estruturas químicas: policetídeos e carotenoides. Dentro da classe dos policetídeos estão as azafilonas que compreendem a classe dos colorantes produzidos pelo gênero *Monascus* (Figura 1) e também espécies de *Penicillium* (MAPARI et al., 2010).

As azafilonas possuem afinidade pela amônia. Os colorantes reagem com as aminas de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos substituindo o oxigênio pelo nitrogênio (STURDIKOVA et al., 2000; OSMANOVA et al., 2010).



**Figura 1:** Estruturas químicas de azafilonas produzidas pelo gênero *Monascus*. A) Ankaflavin. B) Monascina. C) Monascorrubrina. D) Rubropunctatina. E) Rubropunctamina. (Desenhadas com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen)

Os policetídeos também compreendem substâncias da classe química das antraquinonas. O vermelho Arpink Red™ é um exemplo de corante alimentar produzido pelo fungo *Penicillium oxalicum* que pertencem a esta classe (MAPARI et al., 2005). As antraquinonas são substâncias fenólicas derivadas da dicetona do antraceno, um composto orgânico aromático tricíclico com fórmula  $C_{14}H_8O_2$  (CARO et al., 2012; GESSLER et al., 2013). A estrutura química do Arpink Red™ é mostrada na Figura 2.



**Figura 2:** Estrutura química do Arpink Red™. (Desenhada com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen)

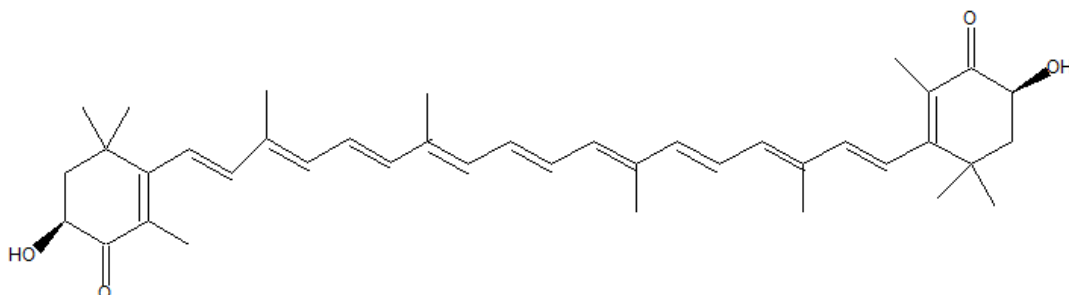
Os carotenoides com mais de 600 estruturas caracterizadas representam um vasto grupo de colorantes presentes na natureza. São responsáveis pelas cores que variam do amarelo ao vermelho e são produzidos por plantas, algas, bactérias, fungos e alguns animais (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; VALDUGA et al., 2009).

As duplas ligações conjugadas que constituem o grupo cromóforo são responsáveis pelas cores dos carotenoides. Quando há, no mínimo, sete ligações conjugadas, as moléculas têm coloração amarela. O aumento no número de ligações conjugadas tornam os carotenoides vermelhos (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

Em micro-organismos, os carotenoides são sintetizados pela rota metabólica dos isoprenoides. São conhecidos aproximadamente 80 carotenoides sintetizados por bactérias fotossintetizantes e fungos filamentosos. Os carotenoides naturais mais estudados e que são produzidos por fungos são  $\beta$ -caroteno, licopeno e astaxantina (VALDUGA et al., 2009).

A astaxantina (Figura 3) é um corante vermelho alaranjado. Sua estrutura química apresenta uma hidroxila (OH) e uma carbonila (C=O) em cada anel o que justifica sua capacidade de ser esterificada, sua característica polar e sua alta atividade antioxidante (LIU e OSAWA, 2007). É bastante utilizado como corante alimentar na pigmentação de carnes de peixes e crustáceos. Salmão e truta são exemplos de animais que tem este corante na sua dieta diária. A alta atividade antioxidante chega a superar as propriedades de  $\beta$ -caroteno

(CHANDI; GILL, 2011). No setor de cosmético pode ser aplicado em produtos para prevenir queimaduras causadas pela exposição aos raios ultravioletas e na área médica é um auxiliar no tratamento de doenças cardiovasculares e imunológicas (LORENZ e CYSEWSKI, 2000).



**Figura 3:** Estrutura química da astaxantina. (Desenhada com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen)

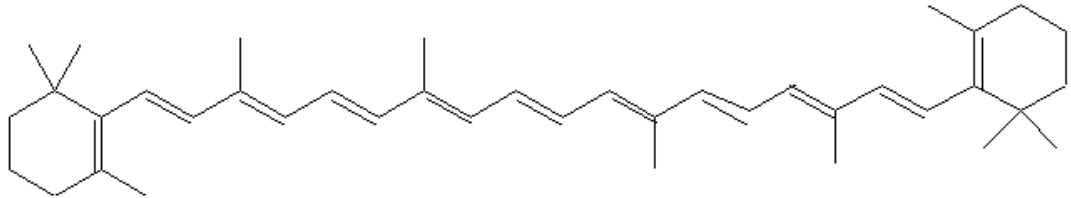
Licopeno (Figura 4) é um colorante avermelhado que contém 40 carbonos dispostos de forma simétrica e acíclica. Por possuir duas ligações duplas não conjugadas que aumentam a sua reatividade, é considerado o carotenoide com o maior poder sequestrante de oxigênio (ANGUELOVA e WARTHESEN, 2000). Na indústria de alimentos pode ser utilizado na aplicação de bebidas, massas, petiscos, cereais, alimentos lácteos, entre outros (CHANDI e GILL, 2011). Seu uso como aditivo alimentar é autorizado na União Européia e desde julho de 2005 também foi aceito nos Estados Unidos (MORTENSEN, 2006).



**Figura 4:** Estrutura química do licopeno. (Desenhada com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen)

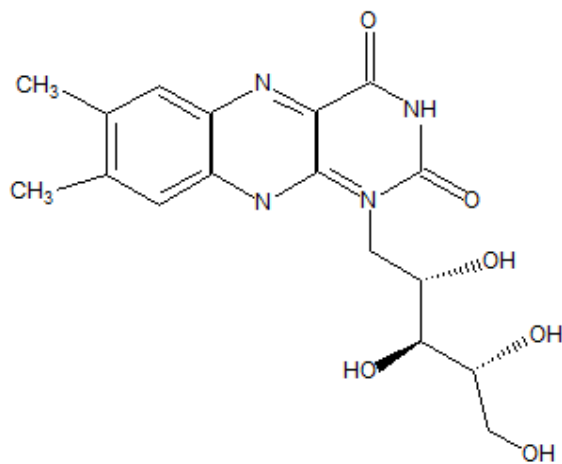
O  $\beta$ -caroteno (Figura 5) tem uma coloração amarela e na sua estrutura química os 40 carbonos estão dispostos de forma bicíclica com dois anéis não aromáticos (WEIL, 2000). São lipossolúveis e insolúveis em água. É um dos carotenoides mais estudados pela sua

propriedade antioxidante. Tem aplicação em produtos alimentícios como queijo, salsichas, presunto e margarina (CANTRELL et al., 2003; CHANDI e GILL, 2011).



**Figura 5:** Estrutura química do  $\beta$ -caroteno. (Desenhada com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen)

A Riboflavina (vitamina do complexo B2) é um colorante amarelo. É hidrossolúvel, apresenta fluorescência e pertence à classe química das flavinas (SOUZA et al., 2005). Essa vitamina é amplamente utilizada em alimentos como cereais matinais, queijo, suco de frutas e formulações para bebês (DAWSON, 2009). A estrutura química da riboflavina é mostrada na Figura 6.



**Figura 6:** Estrutura química da riboflavina. (Desenhada com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen)

Para a elucidação da estrutura química de um colorante, primeiramente, é necessário a associação de algumas metodologias como espectroscopia e cromatografias para sua separação e purificação. Métodos mais sofisticados como cromatografia gasosa e

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também vem sendo utilizados no estudo da composição química destes compostos naturais (OKUMURA et al., 2002).

Dentre os diferentes métodos de separação cromatográficos, pode-se destacar a cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia em coluna (CC). Nessas técnicas, o processo de separação dos componentes de uma mistura é baseado no fenômeno da adsorção (líquido-sólido). A separação ocorre devido a afinidade dos componentes da mistura pela fase estacionária empregada (EWING, 1972).

Após separação e purificação, as substâncias isoladas podem ser identificadas por várias técnicas. As mais utilizadas são a ressonância magnética nuclear (RMN), espectrofotometria (UV-Vis) e espectrometria de massas (MS) (ESCRIBANO-BAILÓN, 2004). A técnica de RMN permite a determinação da estrutura química de um composto através da detecção de campos magnéticos de átomos de carbono e hidrogênio (HARBORNE, 1998).

Antocianinas de Jabolão (*Syzygium cumini*) foram identificadas aplicando as metodologias de cromatografia em papel e cromatografia líquida de alta eficiência (CAMPOS, 2006). Mendonça (2011) isolou e identificou corantes naturais produzidos por actinobactérias empregando metodologias analíticas de cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas, espectrofotometria de UV/visível, infravermelho e RMN.

Jung et al., (2003) analisaram as características da coloração e estrutura química de pigmentos derivados da fermentação pelo gênero *Monascus* utilizando cromatografia em camada delgada, espectrometria de massas, HPLC, espectrofotometria de UV e RMN. Ao avaliarem as características físicas e químicas de um colorante amarelo produzido por *Epicoccum nigrum*, Cretu et al., (2008) caracterizaram os mesmos através de espectroscopia de UV/vis e HPLC.

## 2.4 Influência dos fatores do bioprocesso na produção de colorantes por fungos

Várias substâncias de interesse comercial são produzidas por fungos, como: antibióticos, ácidos orgânicos, enzimas, biocombustíveis, vitaminas e colorantes (CHAKRABORTY et al., 2010). E para a produção em escala industrial destes compostos são utilizados processos fermentativos, tais como a fermentação submersa, devidos às inúmeras vantagens envolvidas nesse tipo de bioprocessos. Há a possibilidade de manipulação de grandes volumes de meio de cultivo com uma maior facilidade. Um meio fermentativo líquido favorece a absorção dos nutrientes e excreção dos metabólitos, diminuindo o tempo de cultivo e conseqüentemente melhorando a produtividade (PEREIRA JR. et al., 2008).

Os principais fatores que podem influenciar na produção de colorantes por fungos em bioprocessos submersos são: composição do meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio), tamanho do inóculo e pH (MEINICKE, 2008).

As exigências nutricionais variam para cada micro-organismo. As fontes de carbono e nitrogênio a serem utilizadas no processo fermentativo devem ser escolhidas com bastante critério, pensando no tipo de produto que se deseja produzir a fim de se obter a máxima produção com um menor custo. A massa das células dos micro-organismos é constituída por cerca de 10% de nitrogênio e 50% de carbono. Portanto, a quantidade mínima necessária para o meio de cultivo pode ser facilmente calculada. A glicose, por exemplo, é uma excelente fonte de carbono para o crescimento celular, porém tem sido descrita como repressora na síntese de enzimas e antibióticos (CARVALHO et al., 2015).

A utilização de concentrações adequadas de inóculo está diretamente relacionada com a duração da fase lag (fase inicial do crescimento microbiano onde as células estão se adaptando ao meio de cultura), taxa de crescimento específica, rendimento de biomassa e qualidade do produto final (SEN e SWAMINATHAN, 2004).

A escolha do pH do meio de cultura é de fundamental importância, pois está diretamente relacionado com o crescimento dos micro-organismos. Cada tipo de micro-organismo possui uma faixa ótima de crescimento. Variações de pH podem ocasionar a morte dos mesmos durante o processo de cultivo. Em fungos, o pH ótimo é de 5 a 6 (PEREIRA JR. et al., 2008).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Produzir, isolar e identificar colorantes produzidos por fungos do solo Amazônico.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Selecionar isolados fúngicos com potencial para a produção de colorantes;
- Isolar e identificar quimicamente o colorante produzido por um isolado selecionado;
- Verificar a influência dos fatores do bioprocessamento na produção do colorante pelo isolado selecionado.

## 4. RESULTADOS

Os resultados da presente dissertação de mestrado serão apresentados no formato de um artigo científico que será submetido à revista *Process Biochemistry*.

### *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 isolado de solo da região Amazônica produz 5-pentadacilresorcinol

Luciana Aires de Oliveira<sup>1</sup>, Marielle Machado Macedo<sup>2</sup>, Jean Lucas da Silva Rodrigues<sup>3</sup>, Maria da Paz Lima<sup>3</sup>, Emerson Silva Lima<sup>4</sup>, João Vicente Braga de Souza<sup>5</sup>, Érica Simplício de Souza<sup>6</sup>

1 *Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas – UEA.* 2 *Centro Universitário do Norte - UNINORTE.* 3 *Departamento de Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.* 4 *Universidade Federal do Amazonas – UFAM.* 5 *Coordenação de Sociedade Ambiente e Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.* 6 *Universidade do Estado do Amazonas – UEA.*

### **Resumo**

O presente estudo teve como objetivo produzir, isolar e identificar colorantes produzidos por fungos do solo Amazônico. Duzentos isolados obtidos de amostras de solo Amazônico e pertencentes à Coleção de Micro-organismos do INPA foram utilizados nesse estudo. Os isolados foram avaliados frente a um screening de produção de colorantes. Os três isolados que apresentaram os colorantes mais intensos foram conduzidos a bioprocessos submersos. O colorante mais intenso, produzido por um dos fungos testados nesses bioprocessos, foi submetido a metodologias de cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna e identificado por métodos espectrométricos (RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C e massas). A substância colorida produzida por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 foi isolada e quimicamente identificada como um alquilresorcinol (5-pentadacilresorcinol). Quanto à influência dos fatores do bioprocessos, a fonte de carbono sacarose e as fontes nitrogenadas extrato de levedura e nitrato de sódio promoveram uma melhor produção do colorante. Os demais fatores avaliados: diferentes concentrações de sacarose e nitrato de sódio combinadas, tamanho do inóculo e pH não apresentaram resultados significativamente diferentes na produção do colorante. Diante dos resultados expostos, concluiu-se que os fungos do solo Amazônico são potenciais produtores de colorantes e mais estudos sobre estabilidade, toxicidade e aplicabilidade desses compostos são necessários para sua posterior inserção no mercado.

**Palavras chaves:** Colorantes, caracterização química, fatores de bioprocessos, solo Amazônico.

## 1. Introdução

Os colorantes sintéticos atualmente presentes no mercado e que são amplamente utilizados pelas indústrias alimentícia, têxtil, cosmética e medicamentos, quando utilizados em excesso causam alguns efeitos tóxicos para a saúde, como mutagenicidade, potencial carcinogênico, hiperatividade em crianças, urticária, indisposição gástrica e vômitos (KOBYLEWSKI e JACOBSON, 2012), além de serem de difícil biodegradabilidade, pois apresentam moléculas muito complexas, o que os torna preocupantes agentes da poluição ambiental (ALI, 2010).

As vantagens da produção de colorantes a partir de micro-organismos incluem a independência das condições climáticas, as cores de tons diferentes, crescimento em substratos de baixo custo, por exemplo, resíduos agroindustriais. Além da possibilidade de produção em pequenos espaços e em larga escala (LOPES et al., 2013). Os colorantes de origem fúngica também apresentam menor toxicidade, maior biodegradabilidade e podem apresentar atividades antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, entre outras (VELMURUGAN et al., 2009; OSMANOVA et al., 2010).

Poucos trabalhos foram publicados investigando os fungos amazônicos como produtores desses compostos. Porém, pode-se destacar o trabalho de Celestino et al., (2014), que, ao estudar fungos do solo Amazônico como produtores de colorantes, obtiveram colorações variando do amarelo ao vermelho. O isolado fúngico que se destacou nesse estudo foi a espécie *Penicillium sclerotiorum*. O colorante isolado neste estudo foi a esclerotiorina, que apresenta atividades biológicas muito peculiares como a inibição das enzimas aldose redutase, lipases, integrases e proteases do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 (OSMANOVA et al., 2010).

Devido a todos esses fatores, a descoberta de novos colorantes de origem microbiana ainda é necessária a fim de suprir os interesses das indústrias que buscam substituir os sintéticos por naturais, dos consumidores que estão cada vez mais preocupados em adquirir alimentos saudáveis, além de contribuir para a preservação da biodiversidade. E o estudo de compostos produzidos por fungos do solo Amazônico também é de grande contribuição para o conhecimento e desenvolvimento da região.

Por isso, o presente estudo tem como objetivo produzir, isolar e identificar colorantes produzidos por fungos do solo Amazônico.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 *Micro-organismos*

Foram utilizados nesse estudo 200 isolados fúngicos provenientes de amostras de solo da mata da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Lat.: 02°95'43''S; Long.: 59°93'39''O) e do Bosque do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (Lat.: 3°09'41''S, Long.: -59°98'77''O). Os mesmos pertencem à Coleção de Micro-organismos do INPA, estão depositados sob os números LM 5634 a LM 5731 e LM 5894 a LM 5993, e foram autorizados para a pesquisa científica pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - CGEN (Processo nº 010344/2013-6).

### 2.2 *Identificação dos isolados*

#### 2.2.1 *Identificação dos aspectos micromorfológicos*

A avaliação dos aspectos micromorfológicos das culturas foi realizada por microcultivo em lâmina como descrito por Riddell, (1950). As culturas foram previamente cultivadas em Ágar Batata Dextrose (BDA). Um bloco de BDA foi transferido com o auxílio de uma pinça estéril para uma lâmina montada dentro de uma placa de Petri, também sob condições estéreis. Pequenos fragmentos da colônia foram semeados nos quatro cantos do bloco de meio e, em seguida, o mesmo foi coberto com uma lamínula estéril. Um pequeno fragmento de algodão previamente esterilizado foi molhado com água destilada estéril, a fim de manter o ambiente úmido. A placa foi incubada a temperatura ambiente até o crescimento da cultura. Após o crescimento, as culturas foram submetidas à ação de formalina (0,5 mL) durante 1 hora. A lamínula do microcultivo foi transferida para uma nova lâmina contendo azul de lactofenol em quantidade suficiente para a visualização do material fúngico.

#### 2.2.2 *Identificação por análise da sequência de nucleotídeos da região ITS do rDNA*

O isolado produtor de colorante foi identificado, quanto a sua espécie, por análise da sua sequência de nucleotídeos da região ITS do rDNA. O DNA fúngico foi extraído a partir

do micélio pelo método Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico, seguindo o protocolo descrito por Ferrer et al., (2001). O Espaço Interno Transcrito (ITS) foi amplificado empregando-se os primers ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') White et al., (1990). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi preparada utilizando os reagentes nas seguintes proporções: 22,5 µL de Tampão (1X), 5 µL de MgCl<sub>2</sub> (2,5mM), 2 µL de DNTps (200 µM), 5 µL de cada Primer (1,0 µM), 0,5 µL de Taq polimerase (1,5U), 5µL de amostra de DNA (20ng) e uma quantidade suficiente de água ultrapura até um volume final de 30µL. As amostras foram encaminhadas ao termociclador (Modelo SuperCycler<sup>TM</sup> SC-200, Kyratec) seguindo as seguintes temperaturas de amplificação 94°C/5min, 30 ciclos de 94°C/30s- 53°C/30s-72°C/1min e 72°C/10min. Os produtos de PCR (8µL) foram visualizados em transluminador de UV após eletroforese (40 min./100 V/100 A) em gel de agarose (1,5%) em tampão TBE 1X, utilizando 2 µL de Orange 6X (Fermentas) como corante da amostra e como corante do gel 6µL de Sybergreen SYBR® Safe (Invitrogen). A purificação do produto de PCR foi feita por precipitação com polietilenoglicol (PEG 20 %). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o Kit BigDye® (Applied Biosystem) em aparelho Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas passaram por análise de bioinformática e comparadas com outras sequências incorporadas ao GenBank.

### *2.3 Seleção dos fungos produtores de colorantes*

Para verificar se entre os fungos isolados do solo existiam aqueles com potencial para a produção de pigmentos extracelulares foi realizada uma avaliação visual dos pigmentos produzidos pelos fungos em meio de cultivo. Os fungos isolados foram repicados em tubos contendo Ágar Czapeck e incubados à temperatura ambiente por 14 dias. Após o desenvolvimento das colônias, foi investigada a presença de pigmentos difundidos no meio de cultura. Também foi verificada a presença de pigmentos solúveis em acetato de etila. Esse solvente foi colocado nos tubos, sobre as culturas, estes tubos foram agitados por 30 segundos em agitador de tubos e mantidos à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, o solvente foi retirado e a presença de cor no solvente foi avaliada (CELESTINO et al., 2014, com modificações). Três isolados testados foram investigados quanto à possibilidade de produzir colorantes em bioprocessamento submerso.

Os bioprocessos submersos foram realizados como descrito por Celestino et al., (2014). Os fungos isolados foram repicados em tubos contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) com Cloranfenicol e incubados à temperatura ambiente por 72 horas. Após 3 dias, os esporos de cada fungo isolado foram suspensos em 9 mL de água destilada estéril e levados à câmara de Neubauer para a contagem. Os esporos obtidos ( $10^4$  cel/mL) foram inoculados em frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL do caldo Czapeck (3.0 g/L de Nitrato de sódio, 1.3g/L de Fosfato de potássio monobásico, 0.5 g/L de Sulfato de Magnésio, 0.5 g/L de Cloreto de potássio, 0.01 g/L de Sulfato ferroso, 30.0 g/L de Sacarose e 1 L de água destilada), pH inicial 5,0. Os frascos foram incubados sem agitação, em local escuro, à temperatura ambiente (28°C) por 14 dias. O colorante mais intenso, produzido por um dos fungos testados nesses bioprocessos, foi conduzido a experimentos de isolamento e de caracterização química.

#### *2.4. Isolamento e caracterização química dos colorantes*

A avaliação da solubilidade dos colorantes produzidos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Santos-Ebinuma, (2013), com modificações. Após 14 dias de fermentação, os meios de cultura contendo os colorantes (50 mL) foram submetidos a sucessivas extrações. Os solventes utilizados foram hexano (20 mL), acetato de etila (20 mL) e água (20 mL). Os solventes foram adicionados, sequencialmente, às culturas e os frascos submetidos à agitação (100 rpm/60 min). Após a extração, foram obtidas duas fases orgânicas e uma aquosa de cada linhagem fúngica: a) fase de baixa polaridade (hexano), b) fase de média polaridade (acetato de etila) e c) fase de alta polaridade (remanescente no meio de cultivo).

O bioprocesso com a linhagem fúngica que apresentou o colorante mais intenso observado no item anterior (2.3), foi replicado com o objetivo de se obter um volume final de 1 litro. Esse volume de filtrado de cultura foi necessário para os estudos de isolamento e caracterização química do colorante.

A fase em acetato de etila contendo o colorante foi submetida a metodologias de cromatografia em camada delgada; cromatografia em coluna Sephadex LH-20 (h= 49 cm,  $\Phi$ = 2,5cm) (Sigma-Aldrich) eluída com metanol; cromatografia em coluna de sílica gel (70-230 mesh; h= 52 cm,  $\Phi$ = 2,5cm) eluída com gradientes de hexano, hexano: acetato de etila, acetato de etila: metanol e metanol; cromatografia em coluna de celulose microcristalina (h=

20 cm,  $\Phi= 3,5\text{cm}$ ) (Merck) eluída com gradientes de hexano, hexano: acetato de etila, acetato de etila: metanol e metanol e coluna cromatográfica de sílica flash (230-400 mesh;  $h= 59$  cm,  $\Phi= 1,5\text{cm}$ ) eluída com o sistema diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v). A estrutura química do colorante foi elucidada utilizando métodos espectrométricos (RMN em 1 e 2- dimensões) em aparelho Bruker Fourier 300 com o solvente deuterado Acetona-D<sub>6</sub>, onde os desvios químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz; espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro MicroTOF-QII (Bruker Daltonics), fonte de ionização ESI. A máxima absorvância ( $\lambda_{\text{max}}$ ) do colorante foi identificada por espectrofotômetro de UV/VIS (Modelo UV SP-1102) com leituras entre 400 a 700 nm.

### *2.5 Avaliação dos fatores do bioprocesso na produção do colorante*

Foram realizados experimentos univariados com o objetivo de verificar a influência de cinco fontes de carbono (sacarose, glicose, galactose, lactose e ramnose) e cinco fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, nitrato de potássio, peptona, extrato de malte e extrato de levedura) na produção do colorante. Em cada experimento, somente a fonte de carbono (30g/L) ou fonte de nitrogênio (3g/L) foram modificadas separadamente (CELESTINO *et al.*, 2014). Também foram realizados experimentos para avaliar o efeito de diferentes concentrações das fontes de carbono e nitrogênio combinadas. Nos frascos, foram combinadas diferentes concentrações de sacarose (10, 30 e 50g/L) e diferentes concentrações de nitrato de sódio (0, 3 e 6g/L). Os fatores tamanho do inóculo ( $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  células/mL) e pH (3, 5, 7 e 9) também foram observados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o bioprocesso foi preparado como descrito no item 2.3. O colorante foi extraído adicionando-se 20 mL de acetato de etila nos frascos. Os mesmos foram submetidos à agitação (100 rpm) por 24 horas e após este período as fases foram coletadas.

### *2.6. Análises estatísticas*

Para avaliar o efeito dos fatores na produção, as fases foram analisadas na máxima absorvância do colorante ( $\lambda_{\text{max}}$ ) em espectrofotômetro de UV/VIS (Modelo UV SP-1102). Quando necessário, as fases foram previamente diluídas em acetato de etila (1:10). Após

obtenção dos dados, os mesmos foram analisados através dos cálculos de média, desvio padrão e Test T de Student.

### 3. Resultados

#### 3.1 Identificação dos isolados

Para poder utilizar as informações da literatura que relacionam colorantes e fungos produtores, todos os 200 isolados fúngicos foram identificados ao nível de gênero por meio de ensaios micromorfológicos. Os principais gêneros isolados das amostras de solo foram: *Aspergillus* (32,5%), *Penicillium* (40%), *Fusarium* (11%), *Mucor* (3%), *Trichoderma* (25%), *Acremonium* (1,5%), *Rhodotorula* (1%), *Paecilomyces* (1,5%), *Oidiodendron* (1,5%), *Fonsecaeeae* (0,5%) e *Gliocadium* (0,5%).










#### 3.2 Seleção dos fungos produtores de colorantes

Com a finalidade de identificar os fungos produtores de corantes, os isolados foram repicados em tubos de ensaio contendo meio de cultura Ágar Czapeck. Após 14 dias, a presença de colorantes na cultura ou difundidos no meio de cultura foram anotados. Observou-se que das 200 linhagens investigadas, 45 foram capazes de produzir colorantes. As colorações obtidas variaram do amarelo ao vermelho. Os isolados *Penicillium* sp. LM 5679, *Penicillium* sp. LM 5903 e *Penicillium* sp. LM 5924 destacaram-se produzindo os colorantes mais intensos e foram selecionados para as demais etapas do presente trabalho.

#### 3.3 Isolamento e caracterização química dos colorantes

Com o objetivo de investigar a solubilidade dos colorantes produzidos pelos três isolados selecionados, bioprocessos em meio líquido foram realizados e os cultivos obtidos foram submetidos a sucessivas extrações com solventes de diferentes polaridades. A três fases obtidas de cada linhagem fúngica para cada solvente utilizado podem ser observadas na Figura 1.



Isolados Fúngicos	Fases		
	Hexano	Acetato de Etila	Água
<i>Penicillium</i> sp. LM 5679			
<i>Penicillium</i> sp. LM 5903			
<i>Penicillium</i> sp. LM 5924			

**Figura 1:** Cores das fases orgânica e aquosa provenientes da partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades dos colorantes produzidos pelos três isolados selecionados (*Penicillium* sp. LM 5679, *Penicillium* sp. LM 5903 e *Penicillium* sp. LM 5924) em bioprocessos em meio líquido.

*Penicillium sclerotiorum* LM 5679 apresentou fases intensamente coloridas nos três solventes utilizados para a extração, e por isso, foi conduzido a experimentos de isolamento e caracterização química. Foi escolhida mais especificamente a fase acetato de etila (157A).

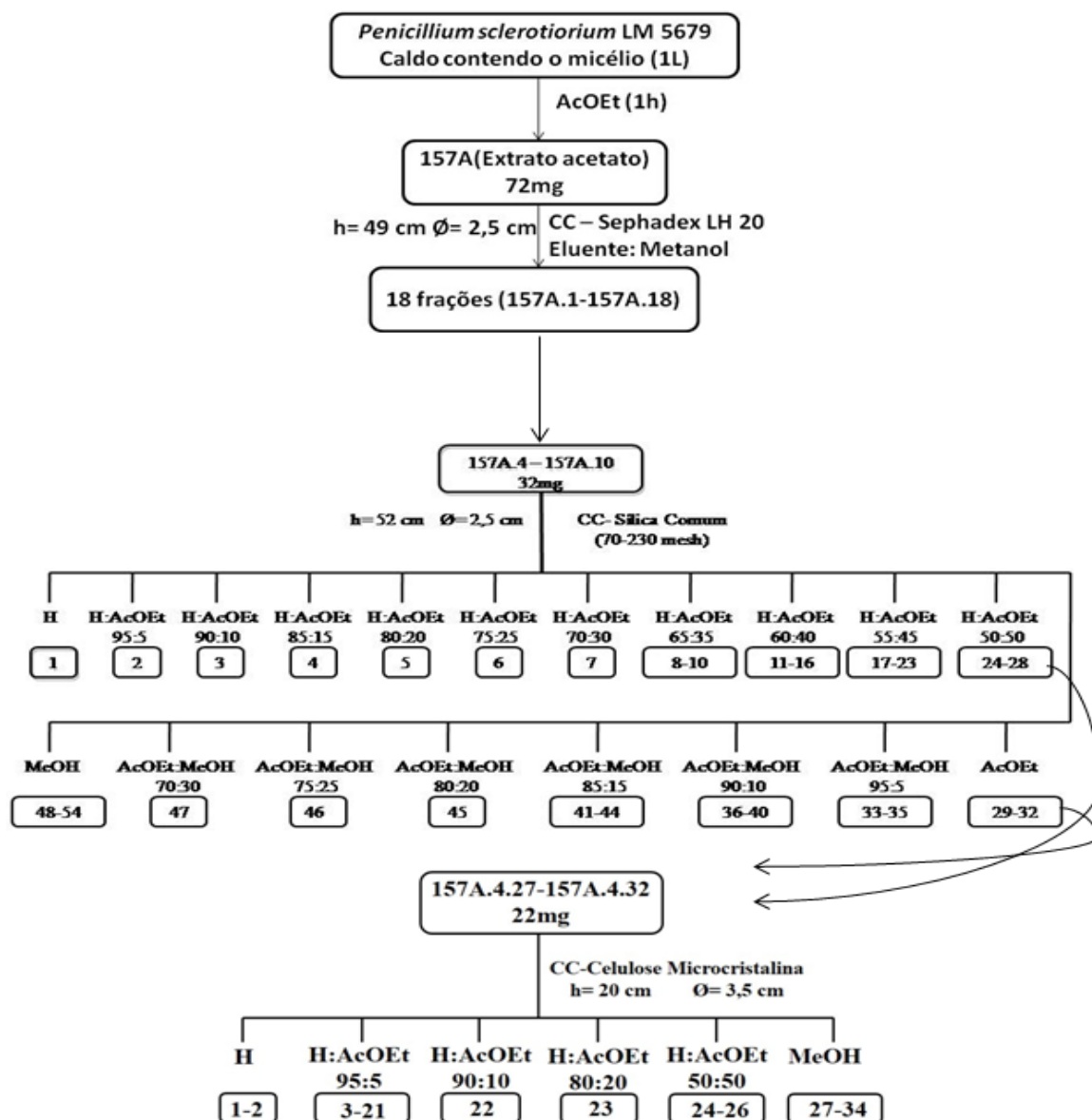
O extrato 157A (72mg) foi fracionado por meio de cromatografia em coluna Sephadex LH-20 (h= 49 cm,  $\Phi$ = 2,5cm) (Sigma-Aldrich) eluída com metanol (Figura 2). Foram obtidas 18 frações e as mesmas foram analisadas em cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando métodos físicos como a luz ultravioleta (254nm/365nm) e como revelador químico a vanilina sulfúrica. As frações 157A.4 a 157 A.10 foram eluídas em hexano:acetato de etila (7:3 v/v) e por apresentarem uma coloração laranja e o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas para novo fracionamento.

A reunião das frações 157A.4-157A.10 (157A.4; 32mg) foi fracionada em coluna cromatográfica de sílica gel (70-230 mesh; h= 52 cm,  $\Phi$ = 2,5cm) e eluída com gradientes de hexano, hexano:acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila:metanol e metanol (Figura 2). Nesse fracionamento, foram obtidas 54 frações. Todas as frações foram concentradas em

evaporador rotativo. Após análise em CCD em hexano:acetato de etila (75:25 v/v), as frações 157A.4.27-157A.4.32 que apresentavam uma coloração amarelo esverdeado foram reunidas para um novo fracionamento.

As frações reunidas (157A.4.27; 22mg) foram submetidas a um fracionamento cromatográfico em coluna de celulose microcristalina (h= 20 cm,  $\Phi$ = 3,5cm) (Merck), a qual foi eluída com gradientes de hexano, hexano:acetato de etila e metanol (Figura 2). Deste fracionamento, 34 frações foram obtidas. As frações 157A.4.27.29-157A.4.27.32 que apresentavam um sólido laranja com presença de cristais foram analisadas em CCD em diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v). Após análise foram reunidas para um novo fracionamento.

A reunião das frações (157A.4.27.29; 56mg) foi adicionada a uma coluna cromatográfica de sílica flash (230-400 mesh; h= 59 cm,  $\Phi$ = 1,5cm) e eluída com o sistema diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v). Deste fracionamento foram obtidas 15 frações. Com a análise das frações em CCD, foi observado que a fração 157A.4.27.29-8 apresentava uma substância isolada. A mesma apresentava-se como um sólido laranja (21mg) e a elucidação da sua estrutura química foi realizada por experimentos de RMN  $^1\text{H}$  500 MHz; RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz; DEPT 150 MHz; HSQC 300 MHz e HMBC 150 MHz. Os desvios químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz.



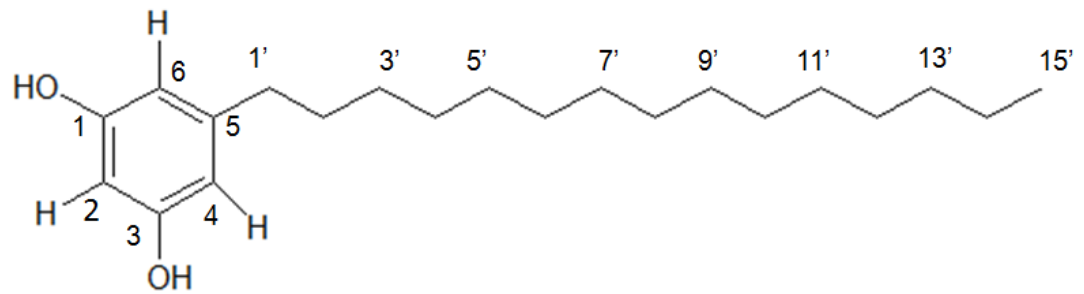
**Figura 2:** Extração e fracionamento cromatográfico em coluna Sephadex LH-20 (eluente: metanol), coluna de sílica gel (eluentes: hexano, hexano:acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila:metanol e metanol) e coluna de celulose microcristalina (eluentes: hexano, hexano:acetato de etila e metanol) do colorante produzido por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.

Os dados observados nos espectros de HMBC juntamente com o espectro de DEPT, permitiram relacionar os carbonos observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  com seus respectivos hidrogênios do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 1). O espectro de massas de alta resolução (modo positivo de ionização) mostrou o pico em  $m/z$  319,2631  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , sugerindo uma fórmula molecular de  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_2$ . Portanto, com base nos dados obtidos de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e em comparação com dados da literatura a substância colorida isolada foi identificada como um alquilresorcinol (5-pentadacilresorcinol), Figura 3.

**Tabela 1:** Dados de RMN do colorante isolado a partir de *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.

Nº	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C*	DEPT	HMBC
1	---	159,29	---	
2	6,18 d (J=2,1 Hz)	100,89	CH	159,29 (C-1, C-3), 107,66 (C-4, C-6)
3	---	159,29	---	
4	6,20 d (J=2,1 Hz)	107,66	CH	159,29 (C-3), 100,89 (C-2), 36,59 (C-1')
5	---	145,84	---	
6	6,20 d (J=2,1 Hz)	107,66	CH	159,29 (C-1), 100, 89 (C-2), 36,59 (C-1')
1'	2,47 t (J=7,5 Hz)	36,59	CH <sub>2</sub>	145,84 (C-5), 107,66 (C-4, C-6), 32,10 (C-2')
2'	1,56 m	32,10	CH <sub>2</sub>	
C-3'-C12'	1,30 -132 m	30,46-30,06	CH <sub>2</sub>	
13'	1,30 m	32,64	CH <sub>2</sub>	
14'	1,30 m	23,33	CH <sub>2</sub>	32,64 (C-13'), 14,37 (C-15')*
15'	0,90 t (J=7,0 Hz)	14,30	CH <sub>3</sub>	32,10 (C-13'), 23,33 (C-14')
<u>OH</u>	8,02			159,29 (C-1), 107,66 (C-4, C-6), 100,89 (C-2)

d=doubleto; t=tripleto; m=multipto \*também foi utilizado o HSQC



**Figura 3:** Estrutura química da substância isolada (5-pentadacilresorcinol) a partir de *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.

### 3.4 Avaliação dos fatores do bioprocesso na produção do colorante

Com o objetivo de verificar a influência dos fatores do bioprocesso na produção do colorante pelo isolado selecionado, foram realizados experimentos univariados avaliando-se os fatores fontes de carbono (sacarose, glicose, galactose, lactose e ramnose); fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, nitrato de potássio, peptona, extrato de malte e extrato de levedura); diferentes concentrações da fonte de carbono sacarose (10, 30 e 50g/L) e da fonte de nitrogênio nitrato de sódio (0, 3 e 6g/L) combinadas; tamanho do inóculo ( $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  células/mL) e pH (3, 5, 7 e 9). A máxima absorvância ( $\lambda_{max}$ ) do colorante foi identificada por varredura em espectrofotômetro de UV/VIS com leituras entre 400 a 700 nm.

As fases resultantes de cada experimento foram analisadas na máxima absorvância do colorante isolado (400nm). Na Tabela 2 é possível observar a influência desses fatores na produção do colorante. Como pode ser observado, dos diferentes açúcares testados, as maiores absorvâncias foram obtidas quando a sacarose foi utilizada como fonte de carbono no meio de cultivo. A maior absorvância no comprimento de onda analisado foi observada quando nitrato de sódio e extrato de levedura foram utilizados como fontes de nitrogênio na produção do colorante. Os fatores concentrações da fonte de carbono sacarose e fonte de nitrogênio nitrato de sódio combinadas, tamanho do inóculo e pH não apresentaram resultados significativamente diferentes na produção do colorante, tanto em relação as absorvâncias encontradas como também as cores observadas nas fases obtidas.

**Tabela 2:** Diferentes fatores utilizados na avaliação da influência das condições de bioprocessamento na produção do colorante por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 em bioprocessamento submerso.

<b>Fontes de carbono</b>	<b>UA<sub>400nm</sub></b>
Sacarose	7,32±1,73
Ramnose	6,37±3,81
Galactose	5,62±2,37
Lactose	2,65±1,88
Glicose	1,22±0,22
<b>Fontes de nitrogênio</b>	
Nitrato de sódio	4,5±5,5
Extrato de levedura	3,4±2,8
Nitrato de potássio	1,41±0,4
Peptona	0,3±0,1
Extrato de malte	0,3±0,2
<b>Fontes de carbono e nitrogênio combinadas (C:N)</b>	
10:6	7,93±6,87
30:3	7,15±5,01
50:3	5,86±0,74
10:3	3,41±4,13
50:6	2,37±2,09
30:6	2,01±3,49
10:0	0,00
30:0	0,00
50:0	0,00
<b>Tamanho do inóculo (células/mL)</b>	
1x10 <sup>2</sup>	16,2±3,07
1x10 <sup>4</sup>	12,5±7,55
1x10 <sup>5</sup>	10,3±2,23
1x10 <sup>3</sup>	6,6±2,57
<b>pH</b>	
3	7,74±3,65
7	6,59±4,11
9	4,42±0,93
5	2,74±2,70

#### 4. Discussão

O presente trabalho demonstrou que *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 produz a substância colorida 5-pentadacilresorcinol. Em adição, foi investigada a influência das condições de bioprocessamento associadas à produção do colorante por esse fungo. Este estudo demonstra o potencial de fungos filamentosos isolados do solo Amazônico como produtores de colorantes e as informações geradas podem vir a ser importantes para o desenvolvimento de tecnologias para produção de colorantes por fungos. Esse é o primeiro trabalho que descreve uma linhagem Amazônica como produtora desta substância, que desperta grande interesse comercial devido às diversas funções biológicas que apresenta.

Nas condições experimentais, os fungos do gênero *Penicillium* destacaram-se na produção de colorantes e a literatura atual corrobora esses achados. *Penicillium herquei* produz um colorante amarelo chamado atrovenetina (TAKAHASHI e CARVALHO, 2010). Arpink Red™, um colorante vermelho comercialmente produzido e que já possui patente em mais de 120 países é produzido pela espécie *Penicillium oxalicum* var. *armeniaca* (SARDARYAN, 2002; SARDARYAN et al., 2004). *Penicillium purpurogenum* produz os colorantes purpurogenona (laranja-amarelado), mitorubrina (amarelo), mitorubrinol (laranja a vermelho) (MAPARI et al., 2005). *Penicillium sclerotiorum* também já vem sendo descrito como produtor de esclerotiorina, um colorante com interessantes atividades biológicas (LUCAS et al., 2007).

A substância colorida produzida por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 foi isolada e quimicamente identificada como um alquilresorcinol (5-pentadacilresorcinol), também denominada de Adipostatina A ou cardol. Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram comparados aos derivados de resorcinol publicados por Barrero et al., (1989).

Os alquilresorcinóis são constituídos por um anel aromático com grupos hidroxila na posição 1 e 3 do anel e de uma cadeia alquila na posição 5, variando em seu comprimento de 1 a 29 átomos de carbono (ZARNOWSKI et al., 2002; ZARNOWSKI et al., 2004). Os alquilresorcinóis são um grupo de metabólitos secundários conhecidos como lipídeos resorcinólicos e pertencem a família dos fenóis. A estrutura característica desse grupo de compostos é originada via condensação de subunidades acetil da acetil-CoA, sendo sintetizados por enzimas policetídicas sintases do tipo III (PKSs III) (STAUNTON e WEISSMAN, 2001; MIYANAGA e HORINOUCI, 2010). Plantas, bactérias, esponjas marinhas e fungos já foram citados como capazes de sintetizar esse tipo de metabólito

(SUAZA-GARCÍA e COY-BARRERA, 2014). Por apresentarem uma molécula anfipática, onde o anel aromático representa a parte hidrofílica e o grupo alquila a parte hidrofóbica, este tipo de composto tem sido descrito como potenciais bioativos com atividades antimicrobianas, antiparasitárias, anticancerígenas, citotóxicas e antioxidantes (CHATURVEDULA et al., 2002; GUNENC et al., 2013; LIU et al., 2012; ZHU et al., 2011). Espécies de fungos filamentosos também já foram descritos como produtores destes compostos como *Fusarium culmorum* (ZARNOWSKI et al., 2000) e *Aspergillus* sp. no qual o metabólito apresentou atividade antimicrobiana contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (YANG et al., 2006).

Os experimentos univariados demonstraram que a fonte de carbono sacarose e as fontes nitrogenadas extrato de levedura e nitrato de sódio promoveram uma melhor produção do colorante. Santos-Ebinuma, (2013) ao investigar a produção de colorantes naturais amarelos, laranjas e vermelhos por cultivo submerso de *Penicillium purpurogenum* DPUA1275 também observou que entre as diferentes fontes avaliadas, sacarose e extrato de levedura mostraram ser mais favoráveis para a produção dos referidos colorantes. Em trabalho realizado por Pradeep et al., (2013), extrato de levedura como fonte de nitrogênio também teve um melhor rendimento na produção do pigmento produzido por *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolado do solo de campo de arroz, como também, do colorante esclerotiorina produzido por *Penicillium sclerotiorum* (isolado do solo Amazônico) (CELESTINO et al., 2014).

O carbono é responsável pela biossíntese de diversos componentes celulares e cada micro-organismo em particular utiliza de forma diferente estas fontes para seu suprimento de energia. A síntese das diversas biomoléculas pode sofrer a ação da repressão catabólica, por isso, a escolha da fonte de carbono é de grande importância para obtenção do metabólito final desejado. Extrato de levedura é rico em vitaminas do complexo B e aminoácidos, o que pode ter contribuído para suprir as exigências nutricionais por parte do micro-organismo estudado e consequentemente em um bom rendimento do colorante produzido (PEREIRA JR. et al., 2008).

Os demais fatores avaliados: diferentes concentrações de sacarose e nitrato de sódio combinadas, tamanho do inóculo e pH não apresentaram resultados significativamente diferentes na produção do colorante. Porém, pode-se destacar que nos experimentos em que não havia a fonte de nitrogênio, independente da variação na concentração da sacarose, não houve produção de cor. Este achado corrobora a importância do uso das fontes de nitrogênio como nutriente pelos micro-organismos, pois afeta diretamente na obtenção do produto de



interesse. O nitrogênio, na célula, representa cerca de 15% da massa seca e é essencial para a formação de aminoácidos e ácidos nucleicos (MADIGAN et al., 2000).

No estudo realizado por Neves, (2016), ao avaliar a influência desses fatores na produção de esclerotiorina por *Penicillium sclerotiorum* também observou que não houve diferenças. Hailei et al., (2011) observou que o pH não teve um efeito significativo na cor do pigmento vermelho produzido por *Penicillium* sp. HSD07B sintetizado durante a co-cultura com *Candida tropicalis*.

As exigências nutricionais variam de um micro-organismo para o outro. A atividade metabólica dos mesmos está diretamente relacionada com a escolha dos nutrientes. Ao conhecer as suas exigências nutricionais e controlar os componentes que possam reprimir o seu desenvolvimento, melhor será a eficácia da conversão do produto de interesse e maior a produtividade. Por isso, é de grande importância o estudo de todos os fatores envolvidos no bioprocessamento (DHAKE e PATIL, 2005).

O presente trabalho apresenta um grande screening de produção de colorantes por fungos do solo e as metodologias de cromatografia em coluna empregadas são muito eficazes para o isolamento destes compostos, de fácil reprodutibilidade, e de baixo custo devido à possibilidade de utilizar solventes mais baratos em comparação aos empregados em cromatografias líquidas de alta eficiência. E os nossos achados contribuem para o desenvolvimento de tecnologias de produção e isolamento de colorantes devido aos poucos trabalhos existentes na literatura que investigaram a produção destes compostos por fungos.

Diante dos resultados expostos, conclui-se que os fungos do solo Amazônico são potenciais produtores de colorantes e mais estudos sobre a estabilidade, toxicidade e aplicabilidade desses compostos são necessários para sua posterior inserção no mercado.

## 5. Referências

- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes—a review. **Water Air Soil Pollut**, 213:251–73, 2010.
- BARRERO, A.F.; SANCHEZ, J.F.; BARRON, A.; CORRALES, F.; RODRIGUEZ, I. Resorcinol derivatives and other components of *Ononis-speciosa*. **Phytochemistry**. v 28, No. I, p. 161-164, 1989.
- CELESTINO, J. D. R.; CARVALHO, E. N.; LIMA, M. P.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M.; SOUZA, J. V. B. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, abr. 2014.
- DHAKE, A.B.; PATIL, M.B. Production of  $\beta$ -glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, n.2, p.170-176, 2005.
- FERRER, C.; COLOM, F.; FRASÉS, S.; MULET, E.; ABAD, J. L.; ALIÓ, J. L. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5 . 8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.
- GUNENC, A.; HADINEZHAD, M.; TAMBURIC-ILINCIC, L.; MAYER, P.; HOSSEINIAN, F. Effects of region and cultivar on alkylresorcinols content and composition in wheat bran and their antioxidant activity. *Journal of Cereal Science*, v. 57, p. 405–410, 2013.
- HAILEI, W.; ZHIFANG, R.; PING, L.; YANCHANG, G.; GUOSHENG, L.; JIANMING, Y. Improvement of the production of a red pigment in *Penicillium* sp. HSD07B synthesized during co-culture with *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, 102. p. 6082–6087, 2011.
- KOBYLEWSKI, S; JACOBSON, M.F. Toxicology of food dyes. **Int J Occup Environ Health**, 18:220–246. 2012.
- LIU, L.; WINTER, K.; STEVENSON, L.; MORRIS, C.; LEACH, D. Wheat bran lipophilic compounds with in vitro anticancer effects. **Food Chemistry**, v. 130, p. 156–164, 2012.
- 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 Eco-Friendly Alternative. **Appl Biochem Biotechnol**. 171:616–625. 2013.
- LUCAS, E.M.F.; DE CASTRO, M.C.M.; TAKAHASHI, J.A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone vi and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* van Beyma. **Braz J Microbiol**, 38:785–9. 2007.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 9th ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA. 2000.
- MAPARI, S. A S.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 231–8, abr. 2005.

MIYANAGA, A; HORINOUCI, S. Type III Polyketide Synthases Responsible for Phenolic Lipid Synthesis. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Springer Berlin Heidelberg. p 519-525, 2010.

NEVES, M.R.P. Produção, isolamento e atividade biológica de colorantes produzidos por *Penicillium sclerotiorum* 2AV2. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Manaus, Amazonas. 2016.

OSMANOVA, N.; SCHULTZE, W.; AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 2, p. 315–342, 21 mar. 2010.

PEREIRA JR, N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Séries em Biotecnologia**. Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro. 62 p v. 1. 2008.

PRADEEP, F. S.; BEGAM, M.S.; PALANISWAMY, M; PRADEEP, B.V. Influence of Culture Media on Growth and Pigment Production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 Isolated from Paddy Field Soil. **World Applied Sciences Journal** 22 (1), p.70-77, 2013.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v.42, p. 265-270, 1950.

SANTOS-EBINUMA, V. C. Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor. São Paulo, 2013.

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

SARDARYAN, E. Food supplement. US Patent 0105864 A1. 2004.

SUAZA-GARCÍA, E. L.; COY-BARRERA, E. C. Alquiresorcinóis: Compuestos Naturales con Importancia Biológica. *Facultad de Ciencias Basicas*. v. 10 (2), p. 210-222, 2014.

STAUNTON, J; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 380-416, 2001.

TAKAHASHI, J. A.; CARVALHO, S. A. Nutritional potential of biomass and metabolites from filamentous fungi. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechno**, p. 1126–1135, 2010.

VELMURUGAN, P. et al. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 262–268, jan. 2009.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. San Diego: **Academic Press**. p. 315-322, 1990.

YANG, S.W.; CHAN, T. M.; TERRACCIANO, J.; LOEBENBERG, D.; PATEL, M.; GULLO, V.; CHU, M. A New 5-Alkenylresorcinol Sch 725681 from *Aspergillus* sp. **J. Antibiot**, v. 59(3), p. 190–192, 2006.

ZARNOWSKI, R.; LEWICKA, T.; PIETR, S. Production and secretion of 5-n-alkylresorcinols by *Fusarium culmorum*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55, p. 846-848, 2000.

ZARNOWSKI, R.; SUZUKI, Y.; YAMAGUCHI, I.; PIETR, S. Alkylresorcinols in Barley (*Hordeum vulgare* L. distichon) Grains. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, p. 57-62, 2002.

ZARNOWSKI, R.; SUZUKI, Y.; ZARNOWSKA, E.; ESUMI, Y.; KOZUBEK, A.; PIETR, S. 5-n-Alkylresorcinols from the Nitrogen-fixing Soil Bacterium *Azotobacter chroococcum* Az12. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 318-320, 2004.

ZHU, Y.; CONKLIN, D.; CHEN, H.; WANG, L.; SANG, S. 5-Alk(en)ylresorcinols as the major active components in wheat bran inhibit human colon cancer cell growth. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3973–3982, 2011.

## 5. CONCLUSÃO

- Os fungos do solo Amazônico são potenciais produtores de colorantes.
- A substância colorida produzida por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 foi isolada e quimicamente identificada como um alquilresorcinol (5-pentadacilresorcinol).
- A sacarose é a fonte de carbono que obteve a maior absorbância no comprimento de onda analisado do colorante produzido.
- As fontes nitrogenadas extrato de levedura e nitrato de sódio apresentaram um melhor rendimento do colorante.
- Os demais fatores avaliados: diferentes concentrações de sacarose e nitrato de sódio combinadas, tamanho do inóculo e pH não apresentaram resultados significativamente diferentes na produção do colorante.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes—a review. **Water Air Soil Pollut**, 213:251–73, 2010.
- ANGUELOVA, T; WARTHESEN, J. Degradation of lycopene,  $\alpha$ -carotene, and  $\beta$ -carotene during lipid peroxidation. **Journal of Food Science**. v.65, n.1, p.71-75, 2000.
- BROWNING, D.F; WHITWORTH, D.E; HODGSON, D.A. Light induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: Functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR. **Mol. Microbiol.**, 48: 237–251, 2003.
- CAMPOS, D. D. P. Extração, Purificação e Isolamento de Antocianinas de Jambolão (*Syzygium cumini*) e Avaliação dos seus Efeitos Biológicos”. Dissertação de mestrado. Departamento de química analítica. Instituto de química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 2006.
- CANTRELL, A; MCGARVEY, D.J; TRUSTCOTT, G; RANCON, F; BOHMM, F. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 412, 47–54, 2003.
- CARO, Y; ANAMALE, L; FOUILLAUD, M; LAURENT, P; PETIT, T; DUFOSSÉ, L. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: An overview. **Natural Products and Bioprospecting**. v.2, p.174–193, 2012.
- CARVALHO, J.C. Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Tese de Doutorado. p.90, 2004.
- CARVALHO, J. C. M.; MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. P.; SATO, S. Tecnologia de fermentações, p.111-112. In: VITOLO, M.; PESSOA JR, A.; SOUZA, G. M.; CARVALHO, J. C. M.; STEPHANO, M. A.; SATO, S. **Biotecnologia Farmacêutica: aspectos sobre aplicação industrial**. São Paulo: Blucher, 2015.
- CELESTINO, J. D. R.; CARVALHO, E. N.; LIMA, M. P.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M.; SOUZA, J. V. B. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, abr. 2014.
- CHAKRABORTY, S; GHOSH, U; CHAKRABORTY, S. Fungi: Its importance in biotechnology -A review on its past, present and future prospects. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 12, p. 3059-3060, 2010.
- 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.
- CHANDI, G. K.; GILL, B. S. Production and Characterization of Microbial Carotenoids as an Alternative to Synthetic Colors: a Review. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 3, p. 503–513, 29 mar. 2011.

CREȚU, R.; BAHRIM, G.; STEFAN, D.; OLTEANU, M. Evaluation of physical and chemical characteristics of yellow colorant produced by *Epicoccum nigrum* MIUG 2.15 in crude extracts and emulsions. **Roumanian Biotechnological Letters**, v. 13, No. 5, supplement, p. 59-68, 2008.

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

DAWSON, T. L. Biosynthesis and synthesis of natural colours. **Coloration Technology**, v. 125, n. 2, p. 61–73, 16 mar. 2009.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our food in the last and next millennium. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 35, p. 5-22, 2000.

DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technol. Biotechnol**, v. 44 (3), n. JANUARY 2006, p. 313–321, 2006.

ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C.; Anthocyanins in cereals. **J. Chromatogr.**, 1054, 129. 2004.

EWING, G.W., **Métodos Instrumentais de Análise Química**, Volume II, Ed. Edgard Blücher LTDA, Ed. da Universidade de São Paulo, 1972.

FANG, T. J.; WANG, J. M. Extractibility of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. **Process Biochem.** v. 37, p. 1235–1245, 2002.

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. Flavonas e flavonóis : novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica Flavones and flavonols : new insights into their chemical structure and biological function. **Revista Agro@ambiente Online**, v. v. 2, n. 2, p. 57–60, 2008.

GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Fungal anthraquinones. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 49(2), p. 85–99, 2013.

GUNASEKARAN, S e POORNIAMMAL, R., 2008. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. **Afr. J. Biotechnol.**,7(12):1894-1898.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods – A guide to modern techniques of plant analysis**. 3rd. ed. New York: Chapman and Hall, 1998.

JONES, J. D.; HOHN, T. M.; T.D. Leathers: Genetically Modified Strains of *Fusarium sporotrichioides* for Production of Lycopene and b-Carotene, **Society of Industrial Microbiology Annual Meeting**. San Diego, USA, p. 91, 2004.

JUNG, H; KIM, C.; KIM, K.; SHIN, C.S. Color Characteristics of *Monascus* Pigments Derived by Fermentation with Various Amino Acids. **J. Agric. Food Chem**, 51, 1302-1306, 2003.

KANG, B.; ZHANG, X.; WU, Z.; WANG, Z.; PARK, S. Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. **Enzyme and microbial technology**, v. 55, p. 50–7, 5 fev. 2014.

KOBYLEWSKI, S; JACOBSON, M.F. Toxicology of food dyes. **Int J Occup Environ Health**, 18:220–246. 2012.

LI, L; SHAO, Y.C; LI, Q; YANG, S; CHEN, F.S. Identification of Mga1, a G-protein  $\alpha$ -subunit gene involved in regulating citrinin and pigment production in *Monascus ruber* M7. **FEMS Microbiol Lett** 308:108–114. 2010.

LIU, X.; OSAWA, T. *Cis* astaxanthin and especially 9-*cis* astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-*trans* isomer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 357(1), p. 187-93, 2007.

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 Eco-Friendly Alternative. **Appl Biochem Biotechnol**. 171:616–625. 2013.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Tibtech* April, v. 18, 2000.

MALIK, K; TOKKAS, J; GOYAL, S. Microbial Pigments: A review. **International J. Microbial Resource Technol**. ISSN 2278 – 3822. 2012.

MAPARI, S. A S.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 231–8, abr. 2005.

MAPARI, S.A.S; THRANE, U; MEYER, A.S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends Biotechnol**, 28:300–7. 2010.

MEINICKE, R. M. Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2008.

MÉNDEZ, A; PÉREZ, C; MONTAÑÉZ, J.C; MARTÍNEZ, G; AGUILAR, C.N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, 12:961–8. 2011.

MENDONÇA, J. N. Identificação e Isolamento de colorantes naturais produzidos por Actinobactérias. Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química. Ribeirão Preto, São Paulo, 2011.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, 26: 177-85, 2008.



- MOHANKUMARI, H.P; NAIDU, A; VISHWANATHA, S; NARASIMHAMURTHY, K; VIJAYALAKSHMI, G. Safety evaluation of *Monascus purpureus* red mould rice in albino rats. **Food Chem. Toxicol.**, 47: 1739-1746. 2009.
- NAGPAL, N; MUNJAL, N; CHATTERJEE, S. Microbial Pigments with Health Benefits - A Mini Review. **Trends Biosci**, 4: 157-160. 2011.
- NAVARRO, E.; LORCA-PASCUAL, J. M.; QUILES-ROSILLO, M. D.; NICOLAS, F. E.; GARRE, V.; TORRES-MARTINEZ, S.; RUIZ-VAZQUEZ, R.M. A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. **Mol. Genet. Genom.** v. 266, p. 463–470, 2001.
- MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 8, p. 1477–1491, 1 jan. 2006.
- OKUMURA, F; SOARES, M.H.F.B.; CAVALHEIRO, E.TG. Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 4, 680-683, 2002.
- OSMANOVA, N.; SCHULTZE, W.; AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 2, p. 315–342, 21 mar. 2010.
- PEREIRA JR, N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Séries em Biotecnologia**. Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro. 62 p v. 1. 2008.
- PRADO, M.A; GODOY, H.T. Corantes artificiais em alimentos. **Alim.Nutr.**, v.14, n.2, p.237-250, 2003.
- RENHE, I. R. T.; VOLP, A. C. P.; VIDIGAL, J. G.; STRINGHETA, P. C. MONASCUS NA NUTRIÇÃO E SAÚDE. **Alim. Nutr**, v. v.17, n.3, p. 337–343, 2006.
- REYES, F. G. R.; PRADO, M. A. JECFA - Aditivos e Contaminantes Alimentares - **Notícias ILSI Brasil** v. 9, n.1, 9.5-6, set. 2001.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia. Editora Edgard Blucher Ltda, 1ª edição, São Paulo, p. 155-157, 2004.
- SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; SATONAKA, K. Y.; MIKI, W.; FUJITA, T.; KOMEMUSHI, S. Properties of a high-torularhodin mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. **J. Biosci. Bioeng.** v. 89, p. 203–205, 2000.
- SANTOS, M. A.; MATEOS, L.; STAHMANN, K. P. Revuelta: Insertional Mutagenesis in the Vitamin B2 Producer Fungus *Ashbya gossypii*. In: **Methods in Biotechnology: Microbial Processes and Products**, v. 18, J.L. Barredo (Ed.), Humana Press Inc., p. 283–300, 2005.
- SANTOS-EBINUMA, V. C. Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor. São Paulo, 2013.

SARDARYAN, E. Food supplement. US Patent 0105864 A1. 2004.

SARON, C; FELISBERT, M.I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v.29, n.1, p. 124-128, 2006.

SEN, R., SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochem. Eng. J.**, v. 21, p. 141–148, 2004.

SIMOVA, E. D.; FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrates, **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 31, p. 115–121, 2004.

SOUZA, A. C. S.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 887–891, 2005.

STAHMANN, K. P.; REVUELTA, J. L.; SEULBERGER, H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 509–516, 2000.

STURDIKOVA, M.; SLUGEN, D.; LESOVA, K.; ROSENBERG, M. Mikrobiálna produkcia farbnych azaphilonovych metabolitov. **Chem Listy**, v. 94, p. 105–110, 2000.

TAKAHASHI, J. A.; CARVALHO, S. A. Nutritional potential of biomass and metabolites from filamentous fungi. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnol.**, p. 1126–1135, 2010.

TAKANO, H; OBITSU, S; BEPPU, T; UEDA, K. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): Identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. **J. Bacteriol.**, 187: 1825–1832. 2005.

TEIXEIRA, M. F. S.; MARTINS, M. S.; DA SILVA, J. C.; KIRSCH, L. S.; FERNANDES, O. C. C.; CARNEIRO, A. L. B.; DE CONTI, R.; DURAN, N. Amazonian Biodiversity: Pigments from *Aspergillus* and *Penicillium* - Characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 6 (3), p. 300-311, 2012.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochem.** v. 40, p. 2551–2557, 2005.

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

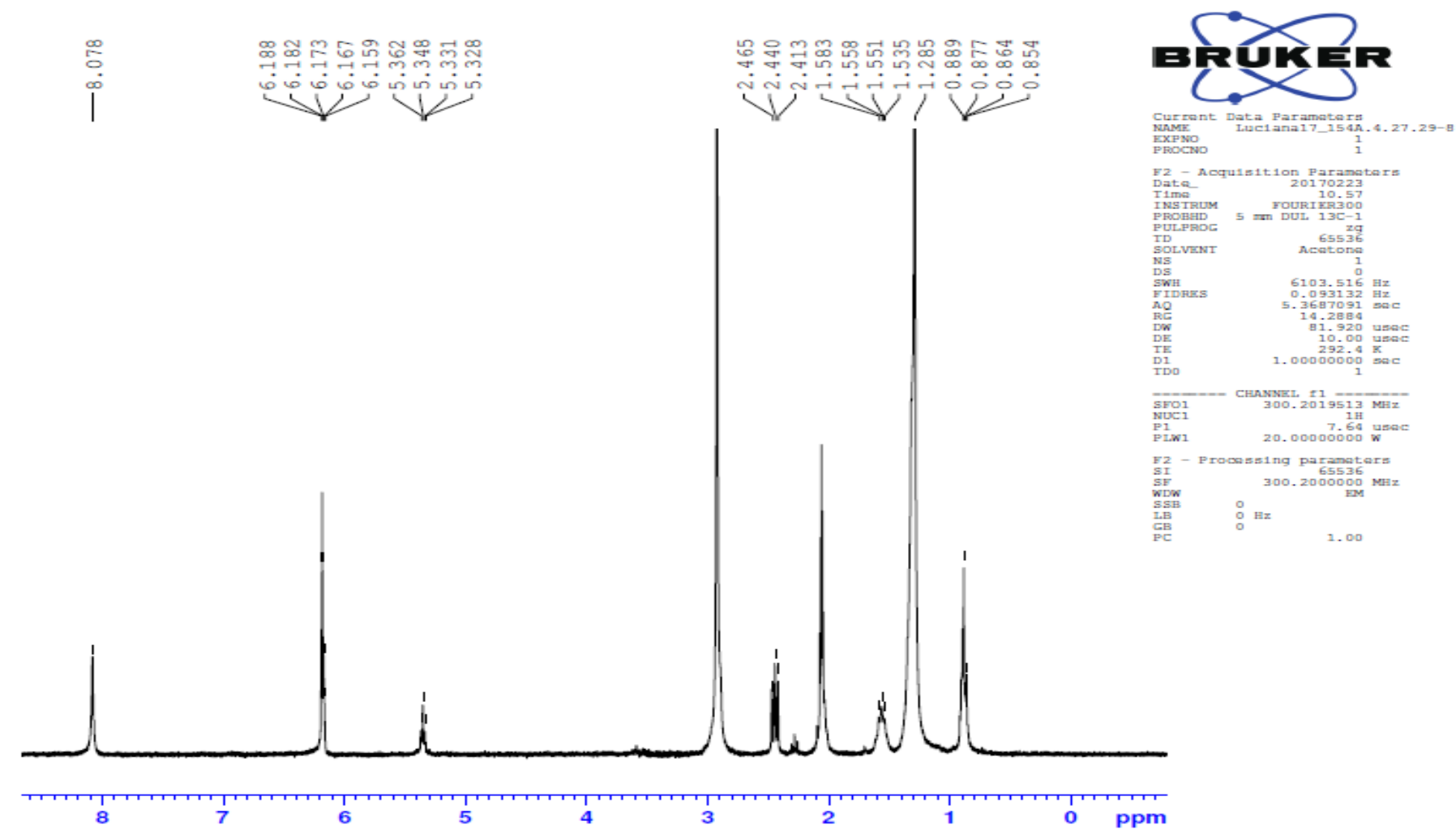
VELMURUGAN, P. et al. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 262–268, jan. 2009.

WEIL, J.H. **Bioquímica Geral**. Fundação Gulbenkian. Lisboa. 2ª edição. p. 316, 2000.

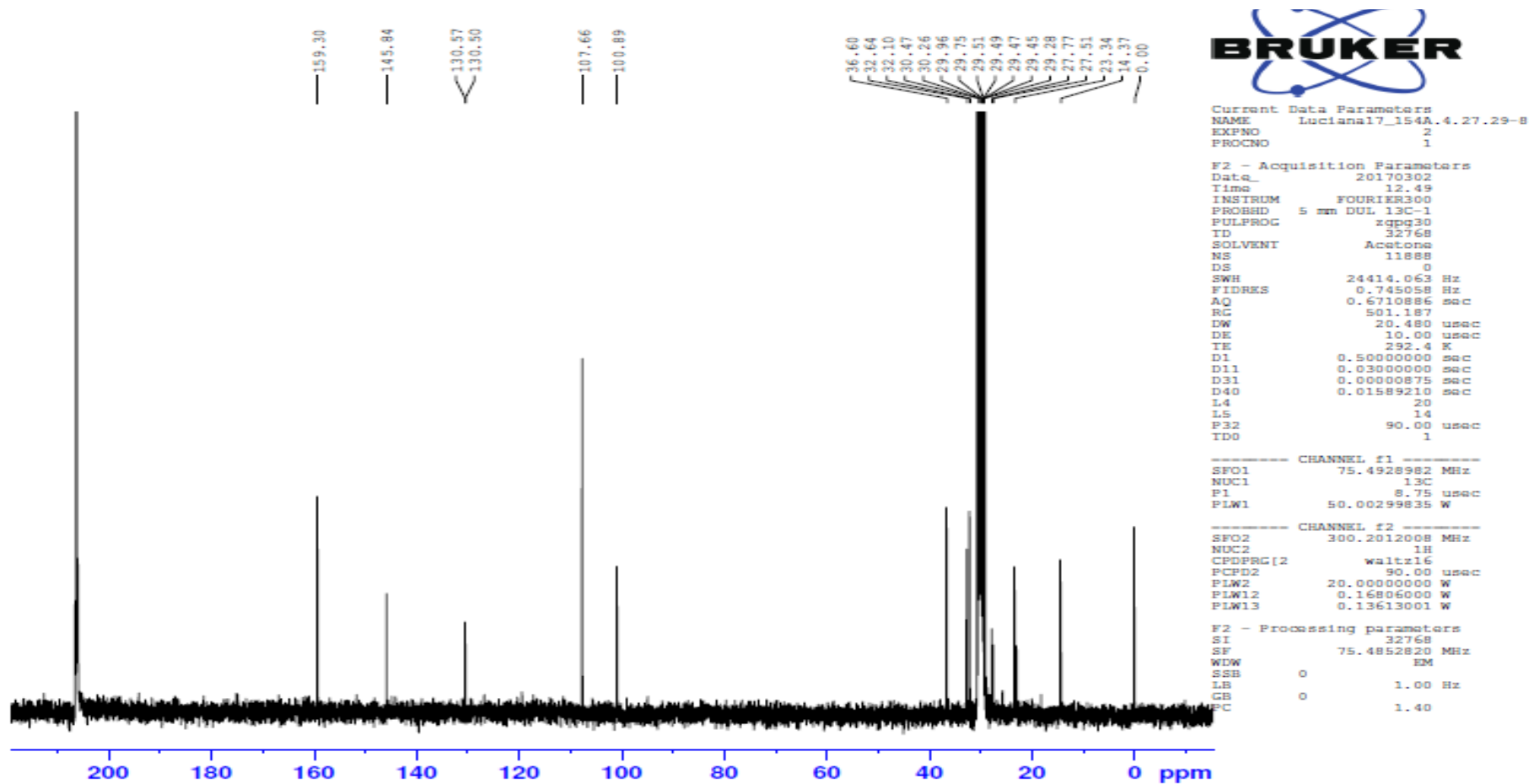
ZHANG, H; ZHAN, J; SU, K; ZHANG, Y. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: characteristics of blue pigment and identification of a novel compound,  $\lambda$ -actinorhodin. **Food Chemistry**, v.95, n.2, p.186-192, 2006.

## 7 APÊNDICE

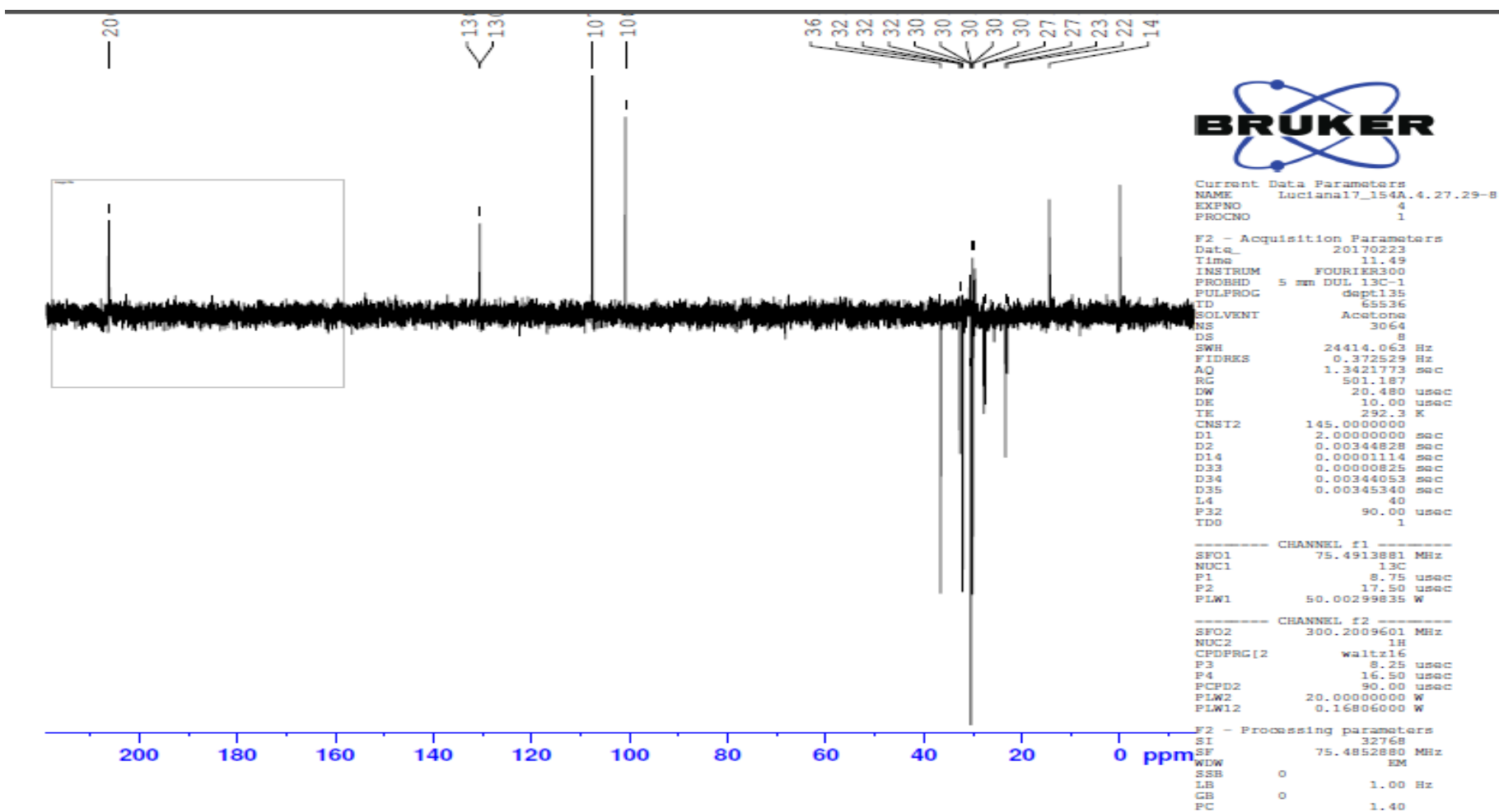
APÊNDICE A: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  -500 MHz do isolado 5-pentadacilresorcinol a partir de *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.



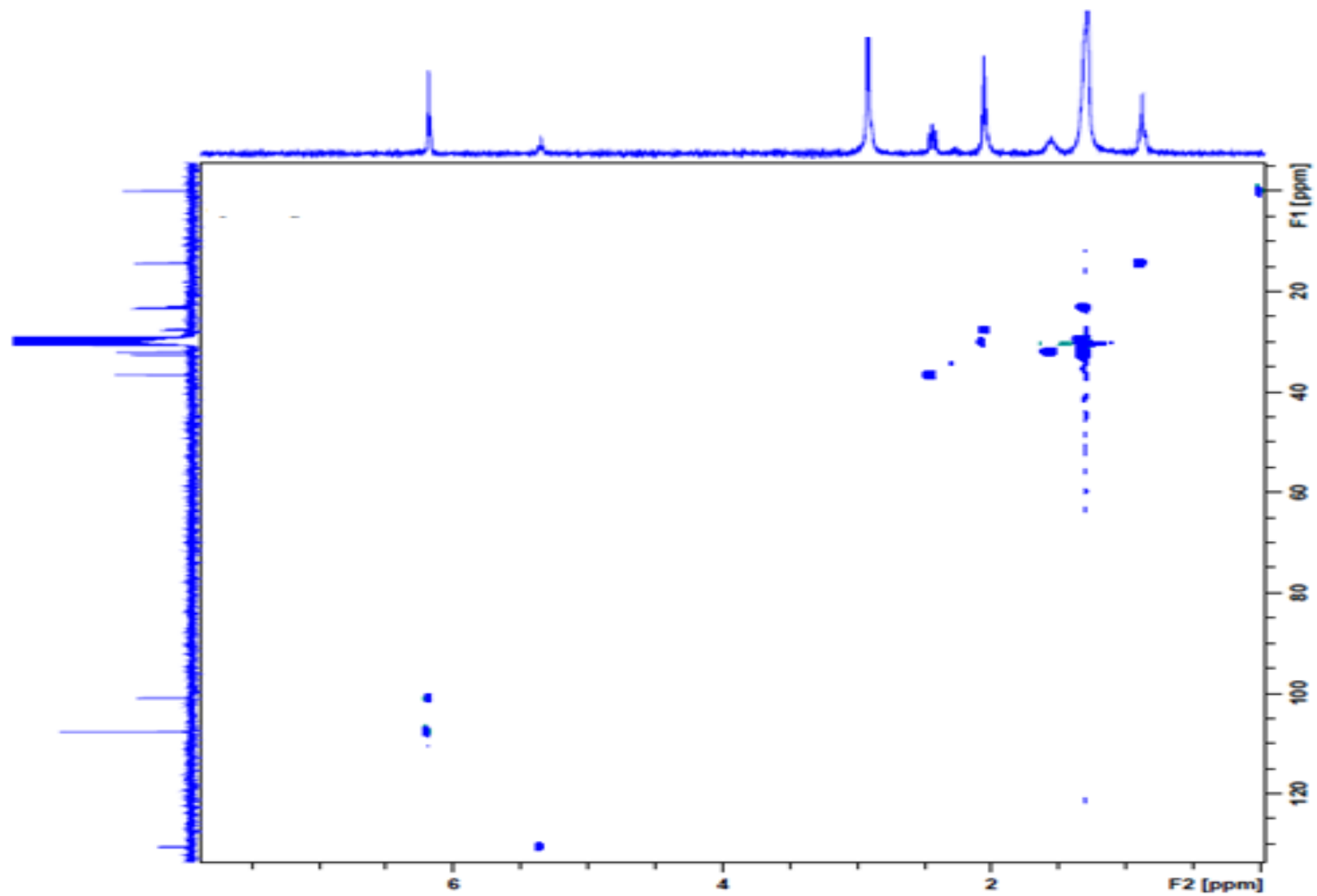
APÊNDICE B: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do isolado 5-pentadacilresorcinol a partir de *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.



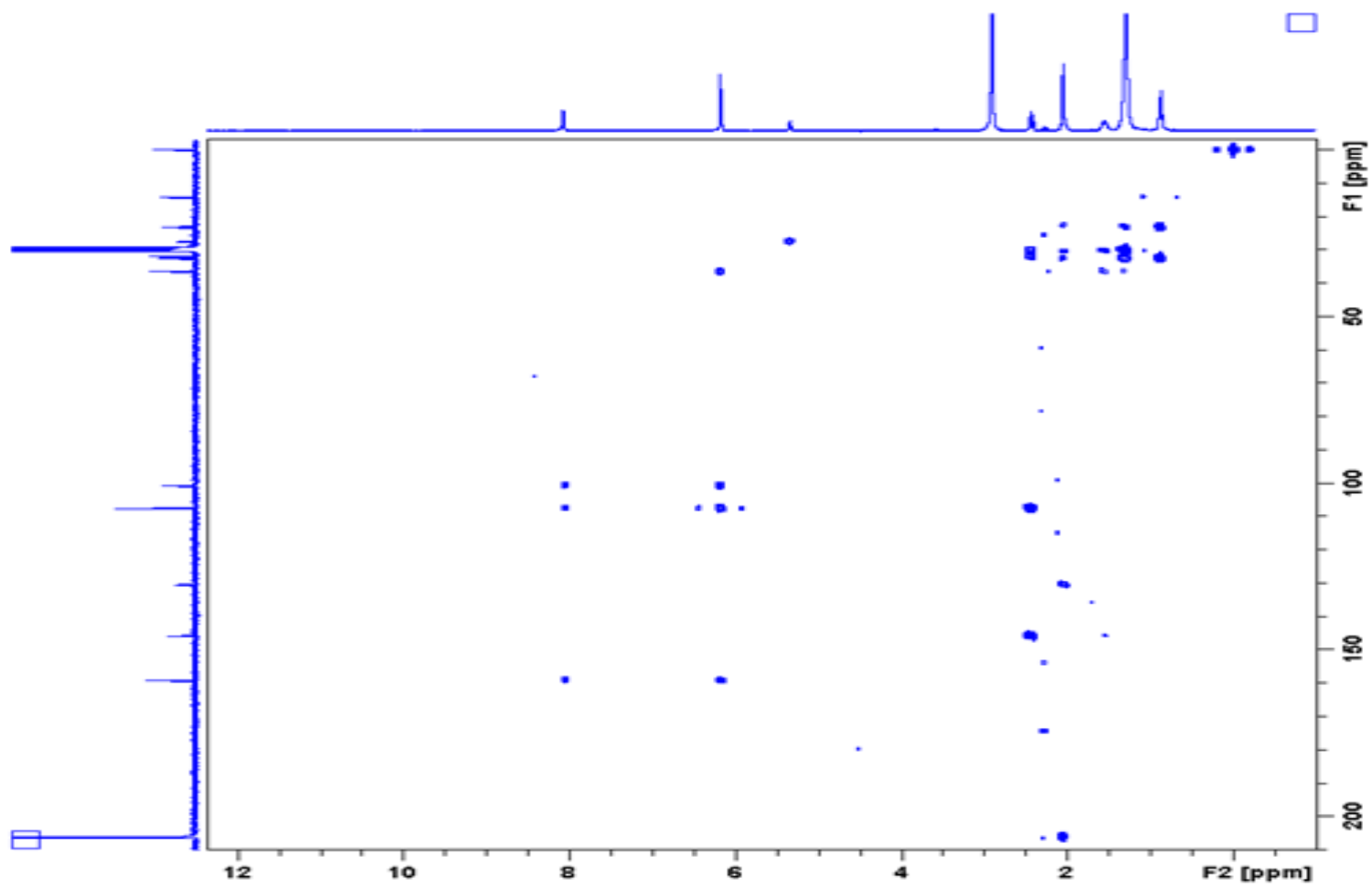
APÊNDICE C: Espectro de DEPT 150 MHz do isolado 5-pentadacilresorcinol a partir de *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.



APÊNDICE D: Diagrama de contorno de HSQC 300 MHz do isolado 5-pentadacilresorcinol a partir de *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.

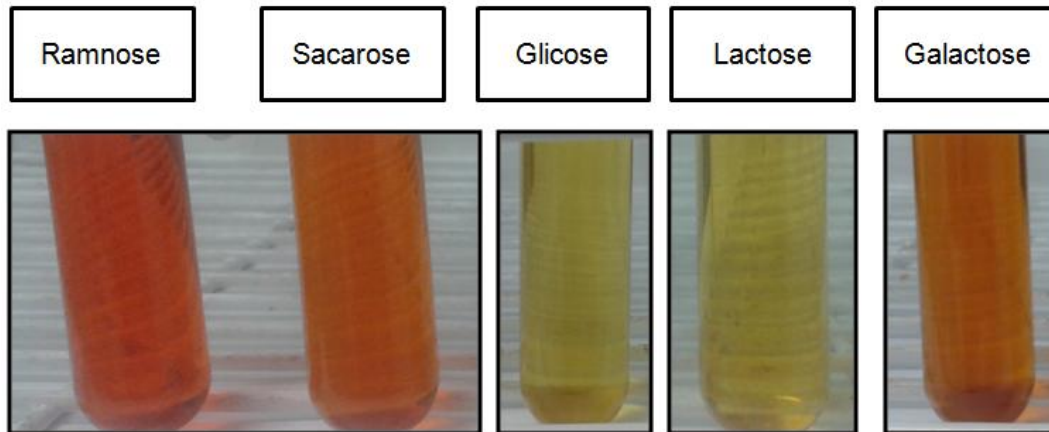


APÊNDICE E: Diagrama de contorno de HMBC 150 MHz do isolado 5-pentadacilresorcinol a partir de *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.

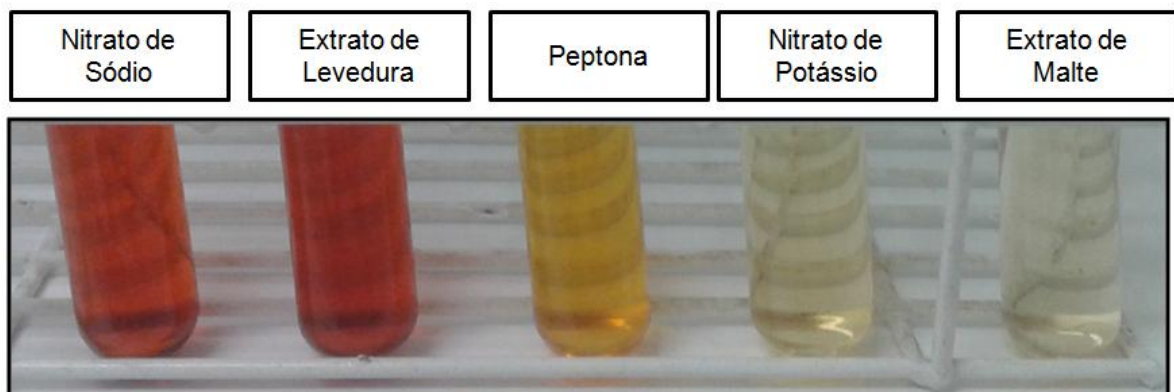




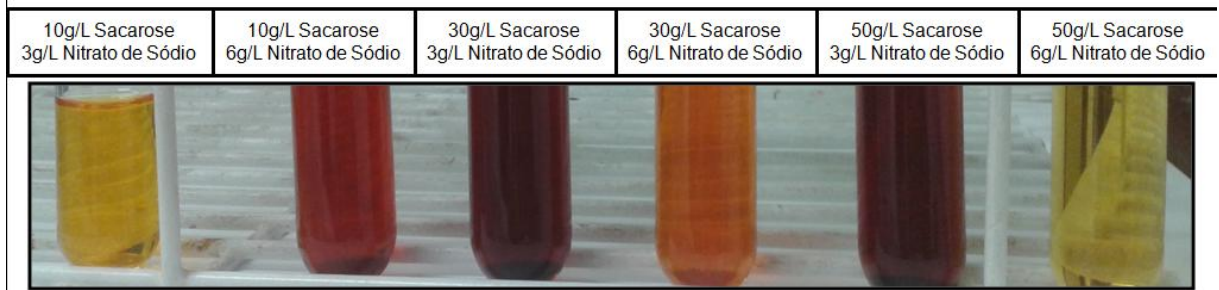
APÊNDICE F: Fases do colorante produzido por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 em diferentes fontes de carbono.



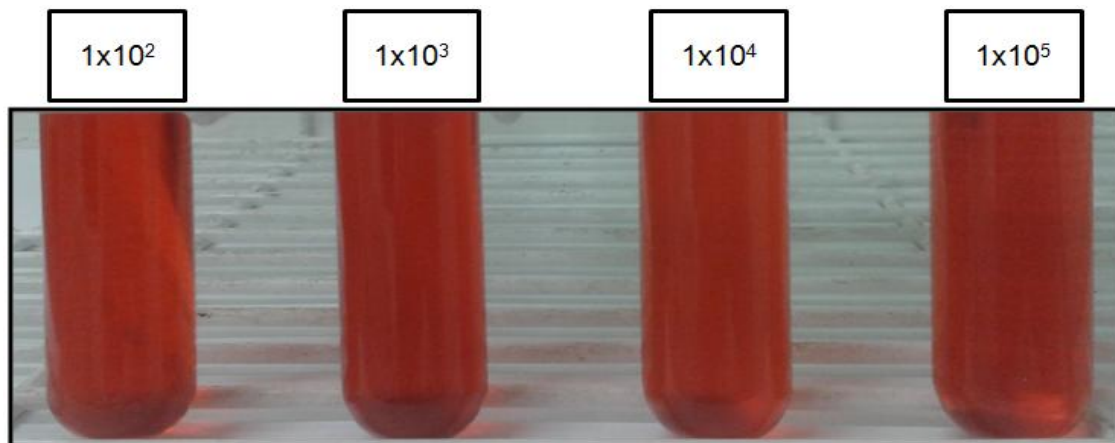
APÊNDICE G: Fases do colorante produzido por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 em diferentes fontes de nitrogênio.



APÊNDICE H: Fases do colorante produzido por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 em diferentes concentrações das fontes de carbono e nitrogênio combinadas.



APÊNDICE I: Fases do colorante produzido por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 em diferentes tamanhos de inóculo.



APÊNDICE J: Fases do colorante produzido por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 em diferentes pH.

