

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PRODUÇÃO DE COLORANTES E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
ESCLEROTIORINA

MÁRCIA REGINA PEREIRA DAS NEVES

MANAUS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

MÁRCIA REGINA PEREIRA DAS NEVES

PRODUÇÃO DE COLORANTES E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
ESCLEROTIORINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amazonas, visando defesa para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Co-orientador: Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima

MANAUS
2016

MÁRCIA REGINA P. DAS NEVES

PRODUÇÃO DE COLORANTES E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
ESCLEROTIORINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Profa. Dra. Karen Regina Carim da Costa Magalhães
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

N518p Neves, Márcia Regina Pereira das
 Produção de colorantes e atividade biológica de esclerotiorina /
 Márcia Regina Pereira das Neves. 2016
 73 f.: il. color; 31 cm.

 Orientador: João Vicente Braga de Souza
 Coorientador: Ádley Antonini Neves de Lima
 Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
 Universidade Federal do Amazonas.

 1. Colorantes. 2. Otimização. 3. Caracterização Química. 4.
 Atividade Biológica. I. Souza, João Vicente Braga de II.
 Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico este trabalho a minha mãe Marta por todo seu apoio e amor incondicional e ao meu pai Ribamar (in memoriam) que sempre estará em meu coração.

*O Senhor é a minha força e o meu escudo;
nele o meu coração confia, e dele recebo ajuda.
Meu coração exulta de alegria,
e com o meu cântico lhe darei graças (Sl 28:7).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter renovado as minhas forças durante essa caminhada.

Ao professor Dr. João Vicente por todos os ensinamentos, conselhos, momentos de alegria, paciência, puxões de orelha e por todas as orientações que me tornaram mais forte e corajosa para enfrentar essa caminhada que é o MESTRADO, tudo isso foi muito valioso, aprendi muito. Muito obrigada!

Ao professor Dr. Ádley por ter aceitado me orientar no início desta jornada e por todos os ensinamentos mesmo a distância e pelas conversas no whatsapp no decorrer deste processo.

A Capes pelo auxílio financeiro e ao INPA por todo o suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao PPGCF pela oportunidade e por todo auxílio.

A minha família, principalmente a minha mãe, por sempre acreditar em mim e por todo seu apoio e amor incondicional. Essa vitória também é sua mamãe! Te amo muito. Aos meus irmãos Alaide, Judith, Gibran e aos meus sobrinhos Judy, Alice, Isabella e Theo. Louvo a Deus pela vida de cada um. E não poderia deixar de citar a minha companheira de todas as horas, minha prima Priscila, por todas as conversas, conselhos, desabafos, confidências, e ajuda em todos os momentos difíceis. Você é muito especial!

A família “micomaníacos”: Ana Cortez, Alita, Ana Karla, Amanda, Ane, Bia, Cissa, D. Lili, Diego Fernando, Diego Rayan, Flávia, Izabelle, Kátia, Luana, Luciana, Luciane, Patrícia, Ralyvan, Silviane, Tatiane, Thaís, Walter. Pessoas que me ajudaram incontáveis vezes e das mais diversas formas, meu sincero obrigada!

Meu agradecimento especial para o laboratório LQPN, em especial a Dra Maria da Paz, Loretta Ennes, Renan Feitosa por todos os ensinamentos, por todas as conversas, na ajuda com os fracionamentos, com os espectros, na identificação da molécula, enfim, nesse mundo das químicas. E também a Yara e a Paula. Meu sincero obrigada!

A professora Waldirene pela hospitalidade e ajuda na cromatografia e por todo apoio quando estive em Coari, seus ensinamentos foram muito importantes.

Agradeço também ao Caio por te me ajudado nos ensaios biológicos e ao professor Émerson.

Não poderia deixar de mencionar um casal que amo demais, Aldemir e Nonata que sempre me deram força, conselhos, apoio em todos os momentos felizes e tristes.

A Karlinha e a Priscilla por toda ajuda em palavras, força, desabafos, momentos de alegrias e por todo apoio nessa jornada.

As minhas amigas Raquel, Jéssica, Rosane e as “alaidetes” por todos os momentos especiais.

E a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a execução deste trabalho.

A vocês, meu muito obrigada!

RESUMO

Ultimamente tem havido um grande interesse por colorantes naturais devido a problemas de toxicidade e biodegradabilidade associados ao uso de colorantes sintéticos. Os colorantes provenientes de metabólitos fúngicos ainda são pouco explorados apesar de apresentarem um potencial biotecnológico muito atraente. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a produção de colorantes e atividade biológica de esclerotiorina. Em seguida, bioprocessos em meio submerso e sólido foram realizados com a finalidade de investigar a influência dos fatores de bioprocessos na produção dos colorantes. Os colorantes produzidos foram submetidos a metodologias de isolamento (cromatografia em coluna, cromatografia de camada delgada) e identificação da sua estrutura química (ressonância magnética nuclear). O colorante esclerotiorina foi adquirido comercialmente e avaliou-se a sua atividade citotóxica e antifúngica. Quanto aos bioprocessos, os fatores: sacarose, peptona, tempo de bioprocessos e agitação orbital tiveram influência nos bioprocessos submersos, enquanto que apenas o fator tempo demonstrou ter influência nos bioprocessos em meio sólido. Não foi possível isolar e nem identificar colorantes com a cepa *P. sclerotiorum* 2AV2, no entanto foi obtido o ácido oleico como componente majoritário em uma fração colorida (PS 4.2). Por fim, quando avaliada a esclerotiorina em bioensaios, essa demonstrou atividade antitumoral frente às linhagens SKMEL-19, SKMEL-28 e MESA-DX. Em acréscimo, pode-se demonstrar a atividade antifúngica da esclerotiorina frente ao fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*. O potencial biotecnológico dos pigmentos produzidos por fungos é grande e motiva novas pesquisas que possam resultar em novos produtos biotecnológicos.

Palavras-chave: Colorantes, Otimização, Caracterização Química e Atividade Biológica.

ABSTRACT

Lately there has been a great interest in natural dyes due to problems of toxicity and biodegradability associated with the use of synthetic colorings. Colorants from fungal metabolites are still underexplored despite having a very attractive biotechnological potential. In this context, the aim of this study was to investigate the production of dyes and biological activity of sclerotiorin. Then in sequence, bioprocesses in a submerged solid media were realized in order to investigate the influence of the bioprocess factors in the production of colorants. The colorants produced were subjected to isolation methods (column chromatography, thin-layer chromatography), and identification of the chemical structure (nuclear magnetic resonance). The sclerotiorin dye was purchased commercially and it was evaluated their cytotoxic and antifungal activity. In relation to the bioprocesses, factors: sucrose, peptone, bioprocess time and orbital shaking had influence in the submerged bioprocesses, while only the time factor was shown to have influence on the bioprocess in a solid medium. It was not possible to isolate and identify colorants with strain *P. sclerotiorum* 2AV2, however the oleic acid was obtained as a major component in a colored fraction (PS 4.2). Finally, when performed sclerotiorin in bioassays, this compound demonstrated antitumor activity against the SKMEL-19, SKMEL-28, and MESA-DX cells. In addition, it can demonstrate the antifungal activity of sclerotiorin against the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. The biotechnological potential of the pigments produced by fungi is great and motivates further research that may result in new biotechnological products.

Key words: Colorants, Optimization, Chemical Characterization, Biological Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura química da esclerotiorina.....	32
Figura 2:	Fluxograma geral apresentando as etapas desenvolvidas na presente dissertação.....	35
Figura 3:	Influência dos fatores concentração de sacarose (a), peptona (b), inóculo (c), pH (d), tempo (e) e agitação em bioprocessamento submerso na produção de substâncias que absorvem no comprimento de onda por <i>P. sclerotiorum</i> 2AV2.....	44
Figura 4:	Influência dos fatores concentração de sacarose (a), peptona (b), inóculo (c), pH (d) em fermentação sólida na produção de substâncias que absorvem no comprimento de onda por <i>P. sclerotiorum</i> 2AV2.....	46
Figura 5:	Estrutura química do ácido oleico.....	48
Figura 6:	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração PS 4.2 proveniente de <i>P. sclerotiorum</i> 2AV2.....	50
Figura 7:	Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) na região de 4,31-0,88 ppm da fração PS 4.2.....	51
Figura 8:	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da amostra PS4.2.....	52
Figura 9:	Expansão de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da amostra PS4.2.....	53
Figura 10:	Mapa de contorno de HSQC (300/75 MHz, CDCl_3) da fração PS4.2.....	54
Figura 11:	Mapa de contorno de HMBC (300/75 MHz, CDCl_3) da fração PS4.2.....	55
Figura 12:	Análise do efeito dose-dependente da esclerotiorina - Quantificação de morte celular pela SKMEL-28, SKMEL-19, MRC-5 e MESA-DX.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

μm - Micrômetros

^{13}C – Carbono 13

^1H – Hidrogênio

A - Acetato de etila

CDCl_3 – Clorofórmio deuterado

BDA- Ágar Batata Dextrose

GRAS- Generally Recognized As Safe

CIM- Concentração Inibitória Mínima

FDA- Food and Drug Administration

rDNA- Ácido Desoxirribonucléico Ribossomal

HIV- Human Immunodeficiency Virus

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

cm- Centímetro

Kg- Kilograma

g- Grama

L- Litro

mg-Miligramas

mL-Mililitro

nm-Nanômetro

pH-Potencial Hidrogeniônico

rpm- Rotação por Minuto

ppm- Parte por milhão

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

EUA- Estados Unidos da América

UV- Ultravioleta

USD- Dólar americano

hs- Horas

β - Beta

v- Volume

μm -Micrômetro

DCM – Diclorometano

h – Altura

H – Hexano

HPLC- High performance liquid chromatography

LC-MS- Liquid chromatography-mass spectrometry

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

TLC- Thin Layer Chromatography

COSY- Correlation Spectroscopy

HMBC-Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HSQC- Heteronuclear Single Quantum Coherence

FT-IV- Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

Hz - Hertz

δ - Deslocamento químico

φ – Diâmetro

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Obtenção do extrato e fracionamento cromatográfico de <i>P. sclerotiorum</i> 2AV2.....	39
Esquema 2:	Fracionamento cromatográfico de PS-4.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Produção de colorantes por fungos.....	25
Tabela 2:	Dados espectroscópicos de ^{13}C , ^1H e HBMC da fração PS 4.2 e ácido oleico.....	49
Tabela 3:	Concentrações da esclerotiorina frente a linhagens tumorais (SKMEL-19, SKMEL-28, MESA-DX) e não tumoral (MRC-5).....	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Corantes e Pigmentos.....	20
2.2 Produção de colorantes por fungos	21
2.2.1 Mercado de colorantes	25
2.2.1.1 Legislação Brasileira.....	27
2.3 Produção de colorantes por <i>Penicillium sclerotiorum</i>	28
2.4 Estratégias para identificação de colorantes por fungos	30
2.5 Atividade biológica da esclerotiorina	31
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Geral.....	34
3.2 Específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Micro-organismos utilizados	36
4.2 Linhagens de culturas de células	36
4.3 Esclerotiorina	37
4.4 Influência dos fatores de bioprocessamento na produção de colorantes por <i>P. sclerotiorum</i> 2AV2.....	37
4.4.1 Bioprocessamento Submerso	37
4.4.2 Bioprocessamento em meio sólido	38
4.5 Isolamento de colorantes de <i>Penicillium sclerotiorum</i> 2AV2.....	38
4.5.1 Obtenção do extrato e fracionamento cromatográfico	38
4.6 Ensaio biológico com o colorante esclerotiorina.....	41
4.6.1 Ensaio de Citotoxicidade.....	41
4.6.2 Ensaio antifúngico.....	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Produção do colorante em bioprocessamento.....	43
5.1.1 Bioprocessamento submerso.....	43
5.1.2 Bioprocessamento em meio sólido	45
5.2 Isolamento de colorantes de <i>Penicillium sclerotiorum</i> 2AV2.....	47
5.2.1 Análise em RMN de ¹ H e de ¹³ C da fração PS 4.2	47
5.3 Bioensaios	56
5.3.1 Ensaio de Citotoxicidade.....	56
5.3.2 Atividade antifúngica sobre <i>Cryptococcus neoformans</i>	58
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE A: Meio Ágar Batata Dextrose	71
APÊNDICE B: Caldo Czapeck	71
APÊNDICE C: Cultivo de <i>Penicillium sclerotiorum</i> 2AV2 em tubo	72

APÊNDICE D: Bioprocesso submerso	72
APÊNDICE E: Bioprocesso em meio sólido	73

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a indústria possui uma grande demanda por colorantes naturais. Isso vem ocorrendo porque as legislações dos países têm apresentado restrições ao uso dos colorantes sintéticos, pois estes podem ser tóxicos e apresentarem ação mutagênica ou carcinogênica (KONGRUANG, 2011), principalmente quando se trata de aditivos alimentares, pelo fato de serem ingeridos diariamente (MAPARI *et al.*, 2010; TICHOTA *et al.*, 2010).

Os colorantes naturais podem ser obtidos de plantas, animais, insetos e micro-organismos, sendo que estes representam uma alternativa promissora em relação aos de origem animal ou vegetal, pois não apresentam problemas de sazonalidade e demonstram grande produtividade. Entre os micro-organismos, os fungos, particularmente, os ascomicetos têm a capacidade de produzir colorantes e secretar uma ampla variedade de cores, o que pode ser adequado no cultivo em grande escala. Os fungos podem produzir colorantes em escala industrial, de forma padronizada e sem causar grandes danos ambientais (MAPARI *et al.*, 2005).

Os colorantes fúngicos possuem o potencial de aplicação na indústria como colorantes naturais pela facilidade de cultivo aliada às condições de otimização, o que pode favorecer o rendimento final do produto. Na literatura existem muitos trabalhos sobre fungos na produção de colorantes, entretanto há uma escassez sobre colorantes de fungos da Amazônia e isto demonstra a necessidade de mais estudos na nossa região (CELESTINO *et al.*, 2014).

Os colorantes provenientes de fungos são metabólitos secundários que muitas vezes não tem função conhecida e ainda são pouco explorados (MAPARI *et al.*, 2010). Recentemente, o Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) isolou de uma amostra de solo da Amazônia uma cepa de *Penicillium sclerotiorum* linhagem 2AV2 produtor de colorante natural amarelo-alaranjado, conhecido como esclerotiorina, uma substância que possui um grande potencial para uso industrial e atividades biológicas interessantes (CELESTINO *et al.*,

2014). Assim, o conhecimento das melhores condições de cultivo, como pH, temperatura e os melhores nutrientes para o crescimento celular e a produção do metabólito de interesse é importante para aumentar a produção de colorantes (SANTOS-EBINUMA, 2013).

Neste contexto, entende-se que existe uma procura por colorantes naturais e a necessidade de novas pesquisas e métodos mais adequados para a produção de colorantes fúngicos em escala industrial, considerando a existência de uma grande diversidade de espécies fúngicas na Amazônia e, com isso, promover um avanço no aperfeiçoamento de tecnologias para o aproveitamento industrial. Desta maneira, este trabalho teve como objetivo investigar a produção de colorantes e a atividade biológica de esclerotiorina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Corantes e Pigmentos

Colorantes são substâncias artificiais ou naturais utilizadas para dar coloração durável a algum, 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. A diferença básica entre corantes e pigmentos está no tamanho de partícula e na solubilidade no meio em que é inserido. Os pigmentos possuem no geral, tamanho de partícula maior e são insolúveis em água, enquanto que corantes são moléculas solúveis em água (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).

O uso de colorantes começou há milhares de anos atrás com as civilizações antigas da China, Índia e Egito. E por muitos anos estes 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; SANTOS-EBINUMA, 2013). 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 pigmentos microbianos são uma alternativa promissora em relação aos obtidos de plantas e animais, por que não apresentam problemas de sazonalidade e podem ser produzidos em grande escala e, além disso, alguns pigmentos microbianos podem ser produzidos a partir de resíduos

agroindustriais, o que torna o processo mais favorável em termos financeiro e ambiental (MEINICKE, 2008; LOPES, 2011).

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).

Assim, 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).

2.2 Produção de colorantes por fungos

A indústria de colorantes tem grande importância econômica. Ela está associada a várias outras indústrias como a de cosméticos, alimentos, farmacêutica e de diagnóstico. E o principal diferencial competitivo de aceitabilidade entre os produtos, muitas vezes se dá pelo uso de colorantes (VALDUGA *et al.*, 2009). A autorização da utilização dos colorantes produzidos por fungos em países desenvolvidos tem fortalecido projetos de pesquisa com o objetivo de explorar a diversidade fúngica (MAPARI *et al.*, 2005, QIU *et al.*, 2010).

Os micro-organismos produtores de colorantes são os fungos, algas e bactérias. Entre as substâncias produzidas estão carotenóides, melaninas, flavinas, quinonas e mais especificamente monascinas, violaceínas ou índigo sendo que muito deles também conferem aos produtos vantagens nutricionais (DUFOSSÉ, 2006; RENHE *et al.*, 2006). Os fungos, particularmente, os

ascomicetos, basidiomicetos e líquens sintetizam e secretam uma vasta classe de colorantes que apresentam diversas cores (MAPARI *et al.*, 2005).

Os cogumelos e líquens apresentam dificuldades no cultivo, e, além disso, não são adequados para a produção industrial em larga escala, em condições laboratoriais. Os ascomicetos na produção de colorantes são mais indicados, pois podem ser cultivados a fim de produzir grandes quantidades destes compostos utilizando uma tecnologia de cultura otimizada. Dessa forma, destacam-se como produtores de colorantes hidrossolúveis as microalgas, porém a baixa produtividade tem prejudicado a comercialização destes colorantes (MAPARI *et al.*, 2005; MAPARI *et al.*, 2010).

Na literatura sobre fungos produtores de colorantes empregados na indústria alimentícia destacam-se os do gênero *Monascus*, uma vez que são produtores de bons colorantes devido à estabilidade na faixa de pH de 2 – 10, estabilidade ao calor e também por apresentarem diferentes cores (MAPARI *et al.*, 2005). Espécies de *Monascus* podem produzir colorante amarelo (ankaflavina e monascina), laranja (rubropunctatina e monascorrubrina) e vermelho (rubropunctamina e monascorrubramina) e a utilização deste fungo é muito difundida no Japão, China, Indonésia, Índia e Coréia. Estes colorantes são utilizados nestes países na coloração de arroz, peixes, vinhos e bebidas (HAJJAJ *et al.*, 2000). O consumo anual de colorantes de *Monascus* no Japão passou de 100 toneladas em 1981 para 600 toneladas no final dos anos 90 (RENHE *et al.*, 2006).

Alguns colorantes produzidos por micro-organismos já são aprovados para consumo e são comercializados, tais como o β -caroteno e a riboflavina. Os carotenóides são responsáveis pelas colorações amarela, laranja e vermelho e são amplamente utilizados nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica (VALDUGA *et al.*, 2009). O único fator limitante aparente na utilização de colorantes naturais provenientes de micro-organismos é a dificuldade na sua

aprovação pelas autoridades legislativas, os quais exigem vários estudos toxicológicos (MENDONÇA, 2011).

Há um grande número de micro-organismos que têm a capacidade de produzir colorantes em rendimentos elevados, incluindo espécies de *Monascus*, *Serratia*, *Cordyceps* e compostos amarelo-vermelho e azul produzido por *Penicillium herquei* e *Penicillium atrovenetum* (HAJJAJ, 2012). Estratégias para extrair o colorante do interior das células fúngicas e a descoberta de novos metabólitos bioativos de interesse comercial, são atrativos que favorecem investimentos nesta área de conhecimento (VENDRUSCOLO, 2009).

Além dos fungos do gênero *Monascus*, os fungos pertencentes ao gênero *Paecilomyces* (CHO *et al.*, 2002), produzem colorantes nas tonalidades vermelha, amarela e violeta. Os micro-organismos que pertencem ao gênero *Aspergillus* também têm sido estudados como potenciais produtores de colorantes naturais (DUFOSSÉ, 2006; HERNANDEZ- RIVERA *et al.*, 2008). Assim também os pertencentes do gênero *Trichoderma* que possuem habilidade em produzir colorantes em diversas tonalidades, que varia do amarelo-esverdeado ao vermelho (CELESTINO *et al.*, 2014).

Espécies de fungos do gênero *Penicillium* também são capazes de produzir substâncias químicas de diversas cores (GUNASEKARAM E POORNIAMMAL, 2008). Tem capacidade de produzir colorantes vermelho e violeta similares a monascorubramina semelhantes aos obtidos por espécies de *Monascus* (CARVALHO *et al.*, 2005; MAPARI *et al.*, 2008; MÉNDEZ *et al.*, 2011). Outros colorantes citados na literatura são as melaninas de coloração marrom escura, sintetizadas por fungos da família Dematiacea (*Wangiella dermatitidis*, *Cladosporium* spp) e *Cryptococcus neoformans* que são espécies patogênicas (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Acredita-se que o corante mais antigo produzido por fungos e utilizado pelo homem é o vermelho koji ou ang-kak, arroz fermentado por um fungo da espécie do gênero *Monascus*, usado na Ásia por séculos como colorante alimentício para vinho vermelho de arroz, queijo de soja

vermelho, carne e produtos de pescado. Apesar de largamente utilizado pelos consumidores asiáticos, esse colorante ainda é proibido na Europa e EUA pela alegação de poder ocorrer micotoxinas durante o processo fermentativo (RENHE *et al.*, 2006).

Nos fungos, acredita-se que os colorantes sejam produzidos por uma necessidade do fungo em proteger-se contra a radiação UV (carotenóides, melanina), para atuar como co-fator em reações químicas (vitaminas) ou até mesmo para afugentar concorrentes, dado que muitos deles são descritos como antimicrobianos e citotóxicos (JALMI *et al.*, 2012; MAPARI *et al.*, 2005).

Alguns critérios devem ser levados em consideração para a seleção de fungos produtores de colorantes tais como: apresentar tolerância a diferentes valores de pH, temperaturas e minerais, capacidade de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio e produzir colorantes em rendimentos elevados. Além disso, não devem produzir micotoxinas nas condições de cultivo em questão, não devem ser patogênicos ao homem e devem ser de fácil manipulação (RAJASEKARAN *et al.*, 2008; LOPES, 2011).

Para que os fungos e demais micro-organismos sejam utilizados em processos industriais, não basta que eles apresentem perfil com altos rendimentos do metabólito de interesse, mas há a necessidade da autenticação de qualidade GRAS (Generally Recognized As Safe) pela Food and Drug Administration (FDA) para a espécie a ser explorada tanto na indústria alimentícia quanto na farmacêutica (TEIXEIRA *et al.*, 2011). A tabela 1 apresenta alguns exemplos de colorantes produzidos por fungos.

Molécula	Cor	Micro-organismo
Antraquinona	Vermelho	<i>Penicillium oxalicum</i>
Atrovenetina	Amarelo	<i>Penicillium herquei</i>
Esclerotiorina	Amarelo-alaranjado	<i>Penicillium sclerotiorum</i>
Licopeno	Vermelho	<i>Blakeslea trispora</i>
Licopeno	Vermelho	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
Monascorubramina	Vermelho	<i>Monascus spp</i>
Naftoquinona	Vermelho sangue	<i>Cordyceps unilateralis</i>

Riboflavina	Amarelo	<i>Ashbya gossypi</i>
Rubropunctatina	Laranja	<i>Monascus spp</i> <i>Blakeslea trispora</i>
β - caroteno	Amarelo-laranja	<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Phycomyces blakesleeanus</i> <i>Penicillium purpurogenum</i>
Desconhecido	Vermelho	<i>Paecilomyces sinclairi</i>
Desconhecido	Azul esverdeado	<i>Penicillium fagi</i>

Tabela 1: Produção de colorantes por fungos

Fonte: Adaptado Dufossé, (2006).

2.2.1 Mercado de colorantes

Os colorantes naturais foram substituídos pelos corantes sintéticos no final do século XIX quando o primeiro colorante, a malveína, de coloração roxa foi sintetizada pelo inglês William Perkin em 1956. No entanto, a fiscalização de órgãos regulamentadores em diversos países tornou-se mais severa, devido a problemas de toxicidade dos colorantes artificiais e, com isso, resultou na utilização dos colorantes naturais e, principalmente no setor alimentício (MAPARI *et al.*, 2010).

A produção de colorantes naturais é muito vantajosa do ponto de vista econômico, uma vez que existe um interesse maior por aditivos naturais em alimentos e cosméticos. Por outro lado, a via de produção natural pode ser, em alguns casos, 10 vezes mais cara que a via sintética (CARVALHO, 2004; MAPARI *et al.*, 2010). Estima-se em quase um bilhão de dólares o mercado mundial de colorantes e ele é o que apresenta um maior crescimento, a uma velocidade de 5 a 10% ao ano (MORITZ, 2005).

O caso mais bem sucedido de colorante natural é o β - caroteno que é produzido por microalgas, que tem custo de cerca de U\$ 1000/Kg contra U\$ 500/Kg por via sintética. Vale

salientar que este colorante natural apresenta efeito terapêutico contra o câncer, característica essa que o colorante de forma sintética não apresenta (SANTOS-EBINUMA, 2013).

O Brasil é um grande mercado para os colorantes tanto como consumidor quanto como produtor devido à sua grande biodiversidade e a evolução do mercado de colorantes na indústria alimentícia e farmacêutica tem evoluído bastante e, com isso, há um crescente interesse pelas pesquisas desses colorantes no país (MEINICKE, 2008).

No mercado de colorantes, os naturais representam 31%, enquanto os sintéticos compreendem 40% e os idênticos aos naturais 29%. O mercado para colorantes naturais está crescendo e estes podem substituir os colorantes sintéticos futuramente. No setor alimentício, o mercado de colorantes, em 2007, era estimado em U\$ 1,15 bilhão, 2,5% superior ao obtido em 2004 (U\$ 1,07 bilhão). Deste mercado, U\$ 465 milhões eram de colorantes naturais, aumento de 4,6% em relação a 2004 (MAPARI *et al.*, 2010; SANTOS-EBINUMA, 2013).

A notoriedade que os corantes naturais vêm assumindo deve-se não só à tendência mundial de consumo de produtos naturais, mas também às propriedades funcionais atribuídas a alguns desses pigmentos. Segundo estimativas, a demanda mundial por colorantes naturais cresce, em média, 5% ao ano, contra 2% em relação aos corantes sintéticos (DOWNHAM E COLLINS, 2000).

É sabido que os colorantes sintéticos oferecem risco aos consumidores e, com isso, o Brasil e outros países tem se esforçado em pesquisas com colorantes naturais, o que faz com que o interesse por produtos naturais esteja crescente no Brasil e no mundo, entretanto, o custo para produção desses colorantes naturais seja bastante elevado, mas mesmo assim há forte tendência no uso destes no mercado interno e externo (MORITZ, 2005).

2.2.1.1 Legislação Brasileira

As cores sempre exerceram um encanto sobre a humanidade e tem um papel importante na aceitabilidade de produtos comercializados nos diferentes segmentos industriais, uma vez que os consumidores julgam a qualidade de um produto pela sua cor. O setor alimentício tem usado por séculos aditivos para realçar ou restaurar a aparência original de seus produtos e para garantir uniformidade, como indicador de qualidade (GOUVEIA, 2007).

Segundo a Resolução – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) Nº 44 de 1977, corante é a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento. Os colorantes permitidos para uso em alimentos são classificados em: corante orgânico natural, obtido a partir de vegetal, ou eventualmente de animal, cujo princípio tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado; corante orgânico artificial, obtido por síntese orgânica, mediante o emprego de processos tecnológicos adequados e não encontrado em produtos naturais; corante orgânico sintético idêntico ao natural, cuja estrutura química é semelhante a do princípio isolado do corante orgânico natural; e corante inorgânico ou pigmento, obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados ao seu emprego em alimentos.

Os colorantes naturais empregados industrialmente são os extratos de urucum, carmim de cochonilha, curcumina, antocianinas e as betalaínas (MEINICKE, 2008). 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, e apenas 11 corantes sintéticos são permitidas (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).

2.3 Produção de colorantes por *Penicillium sclerotiorum*

O gênero *Penicillium* foi descrito pela primeira vez por Link em 1809 e as espécies incluídas neste gênero são amplamente distribuídas por todo o mundo. Geralmente, são saprofíticas na natureza e numerosas espécies possuem um grande valor medicinal e econômico para a humanidade. A grande maioria destes fungos habita o solo, vários vivem sobre a matéria orgânica em decomposição, outros vivem em ambientes secos, madeiras e sementes (KNOB, 2009).

O *P. sclerotiorum* também conhecido como *P. multicolor* foi isolado pela primeira vez a partir do ar em Java, na Indonésia, por KB Boedijn, e, em seguida, descrito por van Beyma (1937). As espécies incluídas neste gênero apresentam os conidióforos predominantemente monoverticilados, ou seja, as fiálides estão unidas diretamente a estipe apresentando apenas um único ponto de ramificação (KNOB, 2009). As colônias caracterizam-se pelo rápido crescimento e sua textura apresenta-se de forma lisa, filamentosa, aveludada, lanosa, com coloração inicial branca e, após maturação, podendo apresentar-se como azul-esverdeada, cinza esverdeada, amarela, cor de rosa, dependendo da espécie (CHAÎNEAU *et al.*, 1999).

P. sclerotiorum é um micro-organismo mesófilo, de coloração esverdeada, com aspecto cotonoso. Está presente em solos (CELESTINO *et al.*, 2014), porém, já foi isolado do interior de planta, podendo, portanto, ser também classificado como fungo endofítico. Os extratos isolados com hexano e acetato de etila de *P. sclerotiorum* apresentam atividade antimicrobiana e anti-HIV (GOMES, 2011).

Em 1940 Curtin e Reilly isolaram um colorante ácido a partir de *P. sclerotiorum*, com um rendimento que compreende 2% do tapete de micélio seco e este colorante ácido foi isolado a denominado esclerotiorina. Esta espécie tem sido de interesse especial por causa da brilhante cor vermelho-alaranjado do micélio quando cultivados em meio Czapek. Este fungo tem sido alvo de estudos por sua capacidade de produzir metabólitos biologicamente ativos, inclusive antibióticos e

a produção de esclerotiorina destaca-se por apresentar potente ação antimicrobiana contra *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* (LUCAS *et al.*, 2010).

O fungo *P. sclerotiorum* produz uma classe de metabólitos secundários biológicos ativos denominados de azafilonas e policetídeos entre os quais se destacam a rotiorina, isocromofilona e esclerotiorina, sendo que esta última é mais descrita na literatura. A esclerotiorina é produzida, por exemplo, pelas linhagens *P. sclerotiorum* LAB18, *P. sclerotiorum* X11853 e *P. sclerotiorum* PSU-A13 e apresenta atividade antimicrobiana (LUCAS *et al.*, 2010; OSMANOVA *et al.*, 2010; ARUNPANICHLERT *et al.*, 2010). Culturas identificadas como *P. sclerotiorum* foram isoladas a partir de muitos países da África, Ásia e América do Norte, sugerindo uma distribuição cosmopolita (RIVERA E SEIFERT, 2011). Muitas espécies de *Talaromyces* e *Penicillium* produzem substâncias que podem ser usadas como colorantes como o mitorubrinol, a mitorubrina, o mitorubrinal e o ácido mitorubrínico (SAMSON *et al.*, 2011).

Foi descrita uma linhagem de *Penicillium* sp. produtora de um cromóforo do tipo antraquinona (GUNASEKARAN E POORNIAMMAL, 2008). O colorante Arpink RedTM é uma antraquinona produzida por *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* e comercializada pela Ascolor Biotech da República Tcheca (JALMI *et al.*, 2012; MAPARI *et al.*, 2010; TAKAHASHI E CARVALHO, 2010;). Outros colorantes de origem fúngica que se destacam são o Atrovenetina (*Penicillium herquei*), Herqueinone (*Roesleria hypogea*), Purpurogenone (*Penicillium purpurogenum*), que são utilizados como aditivos alimentares (MAPARI *et al.*, 2005).

No Amazonas, foi realizado um estudo de isolamento e caracterização química de um colorante produzido por *Penicillium sclerotiorum* 2AV2 que foi identificado como esclerotiorina, sendo um importante colorante que ainda não havia sido descrito para linhagens amazônicas (CELESTINO *et al.*, 2014).

2.4 Estratégias para identificação de colorantes por fungos

A determinação da estrutura química de um colorante é de suma importância para estudos de caracterização antes de sua aplicação biotecnológica. A estrutura de um colorante pode ser elucidada pela associação de metodologias cromatográficas e espectrofotométricas (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Os métodos cromatográficos são empregados na separação de compostos de um extrato. Aplicam-se também, os métodos espectroscópicos, como espectrofotometria em comprimentos de onda da região do ultravioleta e visível, espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear (RMN) ou por detecção utilizando reagentes especiais em CCD (cromatografia em camada delgada) (LOPES, 2011).

A técnica de espectrometria de massas na identificação de novos colorantes naturais provenientes de micro-organismos vem sendo muito utilizada como uma ferramenta inteligente na seleção de espécies promissoras para a produção de colorantes (MENDONÇA, 2011). Técnicas de separação são usadas na identificação de compostos por comparação com padrões, purificação de compostos, separando-os de componentes de uma mistura seja ela biológica, farmacêutica ou alimentícia (ELOY *et al.*, 2012).

De acordo com Gonçalves (2008), foi realizada a caracterização estrutural da molécula do colorante melanina extraído do fungo *Aspergillus nidulans* através de técnicas de espectrometria no infravermelho, cromatografia em camada delgada e a identificação da estrutura do colorante tipo melanina extraído do mutante MEL 1 por meio de espectrometria de massas.

Latha e Jeevaratnam (2010) estudaram a caracterização do colorante carotenóide sintetizado por *Rhodotorula glutinis*, este colorante foi separado por cromatografia em coluna e purificado por cromatografia em camada fina (TLC) e a elucidação estrutural foi realizada por meio da análise espectral de FT-IV e RMN, revelando que as frações principais eram o β -caroteno, toruleno e torulorradina, respectivamente.

Em um trabalho realizado com fungos provenientes do solo capazes de produzir colorantes, foi realizada a caracterização química, onde após o isolamento da substância obteve-se um pó amarelo-alaranjado e pela técnica de RMN foi identificada como esclerotiorina, um metabólito importante que ainda não havia sido descrito por fungos da Amazônia (CELESTINO *et al.*, 2014).

A caracterização estrutural de dois colorantes provenientes do gênero *Monascus* com forte fluorescência amarela, onde os colorantes foram isolados e purificados a partir da levedura de arroz vermelho e as estruturas foram elucidadas por RMN e a técnica espectrometria de massa indicou a forma molecular e as estruturas dos novos colorantes que foram denominados de metoxi monasphilol-A e metoxi monasphilol metoxi-B (HUANG *et al.*, 2014).

Por muitos anos, a maioria dos químicos tinha mais interesse em isolar e elucidar a estrutura de moléculas provenientes do metabolismo secundário do que em seu potencial como bioativos. As técnicas de separação e espectroscopia são ferramentas que fornecem a purificação e análise estrutural que alcançaram níveis importantes de sensibilidade e sofisticação. Por meio dessas técnicas, químicos de produtos naturais têm aplicado ensaios biológicos para o isolamento de metabólitos e estão agora guiando sua atenção para a bioatividade de substâncias naturais (ZANETTE, 2013).

2.5 Atividade biológica da esclerotiorina

Os fungos são conhecidos por produzir uma ampla variedade de compostos biologicamente ativos que têm sido usadas para fins medicinais na África e Ásia desde a antiguidade (OSMANOVA *et al.*, 2010). Desde a descoberta da penicilina, muitos isolados de *Penicillium* foram inseridos em pesquisas em bioprospecção e novos metabólitos continuam a ser descobertos

a partir destes fungos até os dias de hoje, demonstrando o interesse como fontes de moléculas de bioativos a serem usadas na indústria farmacêutica (PETIT *et al.*, 2009).

Os metabólitos bioativos que são produzidos por fungos geralmente pertencem à classe dos ascomicetos e fungos filamentosos, incluindo também fungos endofíticos (fungos que vivem associados com plantas). O número total de substâncias bioativas conhecidas produzidas por fungos é de aproximadamente 8600, representando 38% de todos os produtos microbianos (GOMES, 2011).

A principal aplicação industrial envolvendo espécies do gênero *Penicillium* é a produção de penicilinas. A descoberta foi realizada em 1928 por Alexander Fleming com a produção do metabólito bioativo por meio do *Penicillium chrysogenum* e desde então os estudos sobre esse gênero aumentaram consideravelmente (TAKAHASHI E LUCAS, 2008).

O principal metabólito da espécie fúngica de *P. sclerotiorum* é a esclerotiorina, contudo pode ser produzida por outros fungos e na Figura 1 é demonstrada sua estrutura química, um colorante contendo um átomo de cloro. Este colorante possui algumas atividades biológicas interessantes, como a indução de formação de clamidósporo, que confere ao fungo uma maior resistência térmica (WENG *et al.*, 2004).

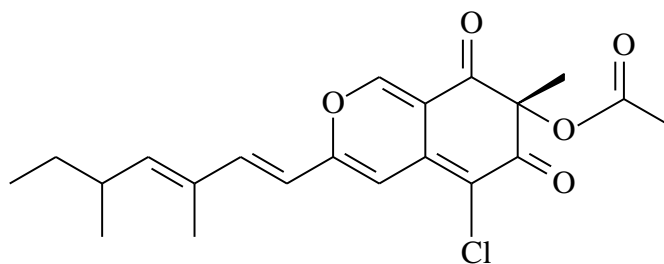


Figura 1: Estrutura química da esclerotiorina

A esclerotiorina foi isolada a partir deste micro-organismo e possui atividades biológicas relevantes tais como a atividade ligadora de receptores de endotelina e inibidora de algumas

enzimas importantes como a lipase e integrases e proteases do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 (LUCAS *et al.*, 2010; OSMANOVA *et al.*, 2010). Ela também inibe a aldose redutase que é uma enzima associada com complicações como catarata, neuropatia e nefropatia de pacientes diabéticos (LUCAS *et al.*, 2010). É relatado na literatura, que a esclerotiorina apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante (CHIDANANDA *et al.*, 2006), atividade fúngica, indutora de apoptose em células cancerosas HCT-116 (GIRIDHARAN *et al.*, 2012; LUCAS *et al.*, 2010; OSMANOVA *et al.*, 2010).

A esclerotiorina vem demonstrando, em estudos realizados, atividades bioativas como a inibição da monoamina oxidase, alvo da ação de antidepressivos, atua também nos receptores de entotelinas, que são responsáveis pela vasoconstrição e ainda possui atividade antibacteriana, com isso demonstrando atividades farmacológicas importantes (WENG *et al.*, 2004; PAIRET *et al.*, 1995).

Há uma aplicabilidade importante na indústria alimentícia, porque atua na inibição da lipoxigenase, uma vez que a peroxidação provoca a rancificação de alimentos, alterando o sabor, odor, coloração e reduzindo seu valor nutritivo. A ação das lipoxigenases em humanos é responsável na inibição de uma grande variedade de desordens, como aterosclerose, alergias, inflamação, asma e hipersensibilidade. Assim, estes inibidores são úteis como antioxidantes na indústria de alimentos e em setores de saúde, devido a seus benefícios farmacológicos (CHIDANANDA E SATTUR, 2007).

Diante da necessidade por novos colorantes naturais e da grande biodiversidade da Amazônia, os fungos são micro-organismos pouco explorados e com alto potencial biotecnológico presente em nossa região e com isso esse trabalho visa buscar a produção de colorantes fúngicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a produção de colorantes e a atividade biológica de esclerotiorina.

3.2 Específicos

- Avaliar a influência dos fatores de bioprocessamento na produção de colorantes em bioprocessamento submerso e bioprocessamento em meio sólido;
- Isolar e identificar colorantes produzidos pelo isolado *Penicillium sclerotiorum* 2AV2;
- Investigar a atividade colorante da esclerotiorina frente a células tumorais SKMELL-19 SKMELL-28 e MESA-DX5 e frente ao fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* VNI PCN6.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento das atividades ocorreu como mostrado na Figura 2.

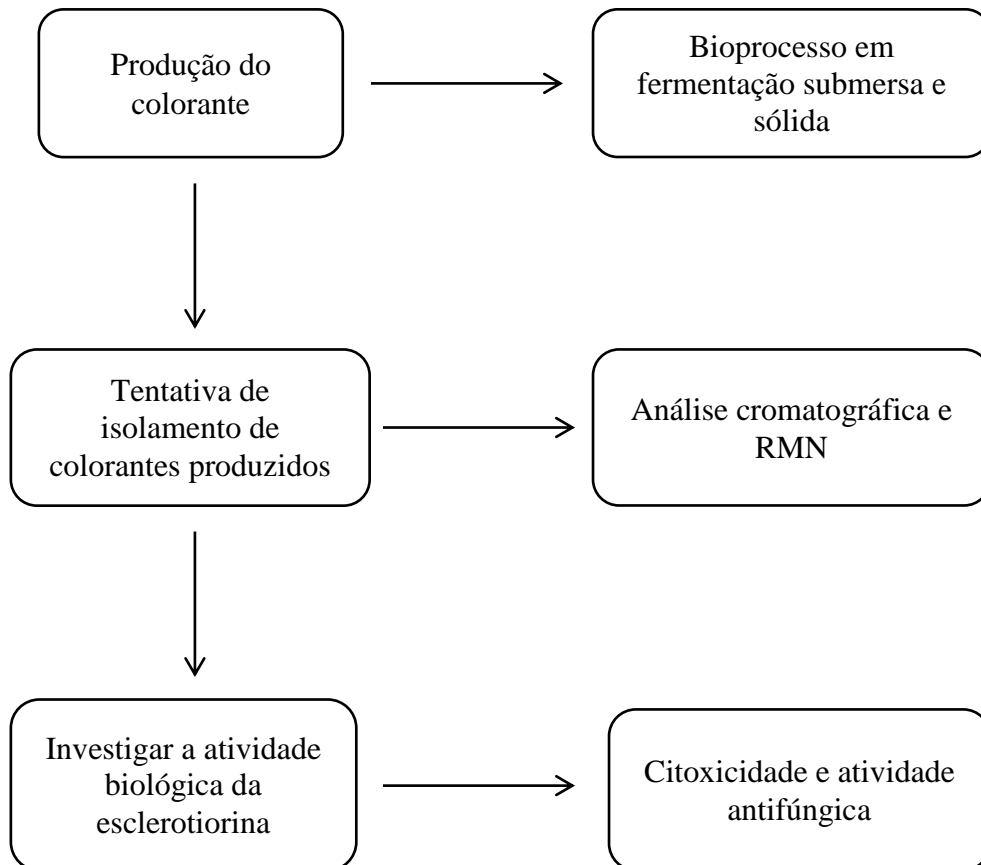


Figura 2: Fluxograma geral apresentando as etapas desenvolvidas na presente dissertação

4.1 Micro-organismos utilizados

O micro-organismo investigado no presente trabalho para a produção de colorantes foi o isolado *Penicillium sclerotiorum* 2AV2. Esse isolado é sabidamente produtor do colorante esclerotiorina (CELESTINO *et al.*, 2014) e pertence à Coleção de Micro-organismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Sua reativação e purificação foram realizadas por meio de repique em Ágar Batata Dextrose-BDA (20 g/L dextrose, 200g infusão de batata e Ágar 15g/L).

A cepa *C. neoformans* VNI PCN6 foi utilizada nos ensaios de avaliação antifúngica. Essa cepa foi isolada de excretas de pombo e pertence à Coleção de Micro-organismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Essa cepa foi mantida em Ágar Sabouraud (40 g/L dextrose, 10 g/L peptona).

4.2 Linhagens de culturas de células

Nos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens MESA-DX5 (linhagem de sarcoma uterino resistente a doxorrubicina), MRC-5 (linhagem de fibroblastos humanos), SKMEL-19 e SKMEL-28 (linhagens de melanoma humano). Essas linhagens pertencem ao Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e estavam conservadas em 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e foram mantidas em estufa bacteriológica a 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C.

4.3 Esclerotiorina

Os bioensaios foram realizados para avaliar a citotoxicidade e a atividade antifúngica (frente à espécie *C. neoformans*) da esclerotiorina. A esclerotiorina (Cayman Chemical) é um colorante sabidamente produzido pela espécie *P. sclerotiorum* e foi adquirido comercialmente por meio do site Wako Chemicals EUA, Inc., para ser utilizado nos ensaios de atividade biológica.

4.4 Influência dos fatores de bioprocessamento na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* 2AV2

4.4.1 Bioprocessamento Submerso

Penicillium sclerotiorum 2AV2 foi repicado para um tubo contendo o meio Ágar Batata Dextrose (Merck) que foi incubado à temperatura ambiente (± 28 °C) por 72 horas. Em seguida, seus esporos foram suspensos com água destilada estéril, quantificados em câmara de Neubauer e transferidos (concentração de 1×10^4 esporos/mL) para Erlenmeyers contendo 25 mL de caldo Czapeck modificado (Merck) (3,0 g/L de peptona, 1,0 g/L de K_2HPO_4 , 0,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g/L de KCl, 0,01 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 30,0 g/L de sacarose). Esse cultivo foi incubado de forma estática, a temperatura ambiente (± 28 °C) e mantidos em local escuro por 25 dias. Após esse período foi realizada a extração e quantificação dos colorantes produzidos. A extração foi realizada colocando-se 10 mL de acetato de etila (Nuclear) no cultivo e submetendo o mesmo a agitação orbital (Tecnal Te-140) por 24 h. A análise da produção de colorantes foi realizada avaliando o solvente em espectrofotômetro de UV / VIS (Modelo No. UV-1102 SP) por meio da máxima absorvância das azafilonas produzidas por *Penicillium sclerotiorum* 2AV2 ($\lambda_{max} = 350$ nm) de acordo com Celestino *et al.*, 2014.

A partir dessas condições descritas, foi investigada, de forma univariada, a influência dos fatores: concentração da sacarose (Merck) (0, 30, 60 e 90 g/L), concentração de peptona (Merck) (0, 3, 6 e 9 g/L), pH (5,6,7,8), inóculo (1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 células/mL), tempo de bioprocesso (25, 30, 35 e 40 dias) e agitação (0 e 100 rpm).

4.4.2 Bioprocesso em meio sólido

Esses experimentos foram realizados de forma similar ao descrito no item anterior, no entanto, foi acrescentado 18 g/L de ágar ao Czapeck modificado (Merck).

Também de forma similar, foi investigada a influência dos fatores de cultivo: concentração da sacarose (30, 50, 70 e 90 g/L), concentração de peptona (3, 5, 7 e 9 g/L), pH (4,5,6,7), inóculo (1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 células/mL) e tempo de bioprocesso (20, 25, 30 e 35 dias).

4.5 Isolamento de colorantes de *Penicillium sclerotiorum* 2AV2

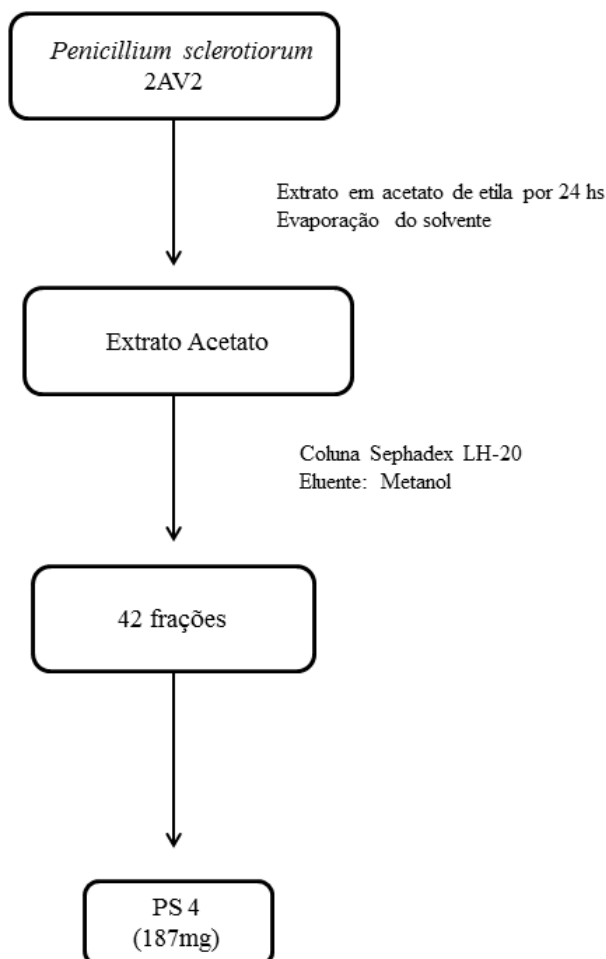
4.5.1 Obtenção do extrato e fracionamento cromatográfico

Foram preparados 400 mL de Ágar Czapeck modificado (Merck) e transferido para Erlenmeyers de 2L e inoculado com 1×10^4 células/mL. Três replicatas desse cultivo foram realizadas afim de obter colorante suficiente para a caracterização química. Esses cultivos foram incubados por 25 dias, sendo que, após esse período, foi realizada a extração dos colorantes.

Sabendo-se da afinidade das azafilonas de *P. sclerotiorum* 2AV2 por acetato de etila, 400 mL desse solvente foram colocados em cada Erlenmeyer. Esses foram submetidos à agitação orbital a

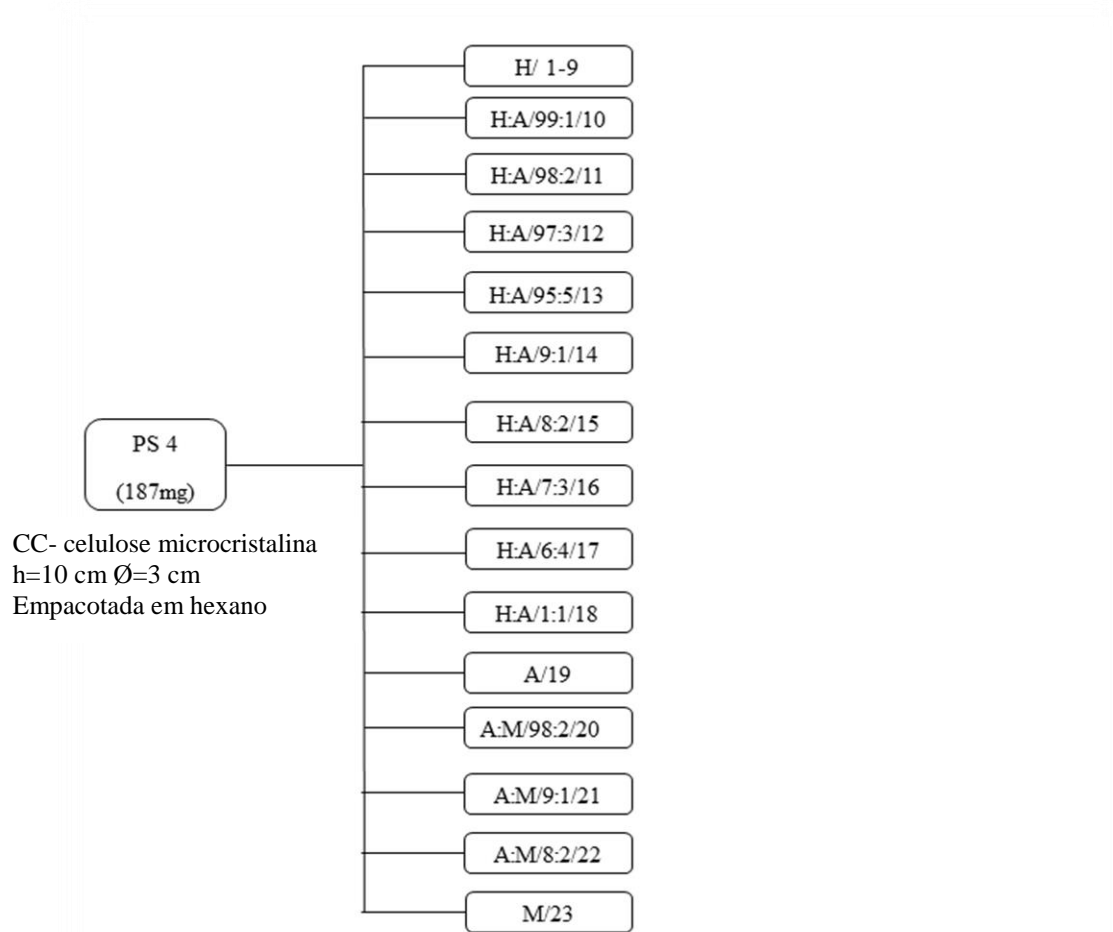
100 rpm por 24 horas. Após esse período, o solvente, contendo os colorantes extraídos, foi filtrado em papel de filtro e concentrado em temperatura ambiente até sua completa evaporação.

Em seguida, o concentrado foi fracionado por meio de cromatografia em coluna Sephadex LH-20 (h x Ø = 52.0 x 3.0 cm) (Sigma- Aldrich Co, St. Louis, MO) usando metanol como eluente (Esquema 1). Deste fracionamento, foram obtidas 42 frações, das quais as frações 2-10 continham coloração amarelo-alaranjada. As frações foram analisadas em cromatografia em camada delgada e reunidas de acordo com suas similaridades. A fração 4 (PS-4, 187mg) foi escolhida para dar continuidade ao estudo.



Esquema 1: Obtenção do extrato e fracionamento cromatográfico de *P. sclerotiorum* 2AV2

Na análise em CCD da fração 4 (PS-4,187 mg), utilizando o sistema de eluição em diclorometano:acetato de etila (98:2 v/v) sob luz ultravioleta a 365 nm foi observada a presença de um pigmento de coloração amarela que foi revelado em vanilina sulfúrica. Sendo assim, esta fração foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna de celulose microcristalina (Esquema 2), eluída em hexano, gradientes de hexano: acetato de etila, acetato de etila e metanol. Deste fracionamento, foram obtidas 23 subfrações, que foram reunidas e pesadas após análise em CCD. A reunião das subfrações 2-3 (PS-4.2; 40 mg), que continham o pigmento amarelo, foi analisada em RMN num aparelho Bruker Fourier 300 e os desvios químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz.



Legenda: A-acetato de etila; H-hexano; M- metanol.

Esquema 1: Fracionamento cromatográfico de PS-4

4.6 Ensaios biológicos com o colorante esclerotiorina

4.6.1 Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada como descrito por Nakayama *et al.* (1997). Neste ensaio, as células de MESA-DX5 (linhagem de sarcoma uterino resistente a doxorrubicina) foram plaqueadas na concentração de 7×10^3 , enquanto que as linhagens MRC-5 (linhagem de fibroblastos humanos), SKMEL-19 e SKMEL-28 (linhagens de melanoma humano) foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com esclerotiorina em diferentes concentrações, durante período de tratamento de 72 horas. Como controle negativo foi utilizado somente meio de cultura e DMSO 0,01 % (veículo). Após o período de tratamento foram adicionados 10 μ L de resazurina 0,4% (diluída 1:20) em cada poço da placa. Aguardou-se o tempo necessário de metabolização da resazurina padronizado de acordo com cada tipo celular variando de 1 a 3 horas. Em seguida, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de placas de ELISA (Beckman Coulter® - DTX800). A viabilidade foi calculada da seguinte maneira: % viabilidade = $F_t \times 100 / F_b$; onde F_t = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e F_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina). Para o cálculo da determinação da CI_{50} foi utilizado o programa GRAPHPAD Prism 6.0. Os dados foram analisados por regressão não linear.

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{F_t \times 100}{F_b}$$

4.6.2 Ensaio antifúngico

O ensaio de sensibilidade antifúngico foi realizado de acordo com a técnica de microdiluição em caldo - protocolo M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Para tanto, primeiramente foi preparado o inóculo de *Cryptococcus neoformans* numa concentração final de $\sim 2,5 \times 10^6$ células por mL. A esclerotiorina em estudo foi testada como agente antifúngico, onde foram realizadas diluições seriadas (concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ a 0,004 $\mu\text{g/mL}$) em microplaca de 96 poços para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM). A microplaca foi incubada a 35 °C por 24 horas em uma estufa bacteriológica, após este tempo, realizou-se visualmente a leitura da CIM. A leitura foi realizada comparando os poços do controle positivo (Inóculo fúngico + Meio de cultivo RPMI) e os poços contendo substância antifúngica teste. A anfotericina B foi utilizada como droga controle de sensibilidade para *C. neoformans* VNI PCN6 e os testes foram realizados em duplicata (CLSI, 2008).

5. RESULTADOS

5.1 Produção do colorante em bioprocesso

5.1.1 Bioprocesso submerso

Foram realizados experimentos com a finalidade de investigar a influência dos parâmetros de bioprocesso submerso para a produção de colorantes. Para tanto, experimentos univariados foram realizados avaliando-se os fatores: concentração de sacarose (0-90 g/L), concentração de peptona (0-9 g/L), pH (5-8), tempo (25-40 dias), tamanho do inóculo (1×10^2 - 1×10^5 esporos/mL) e agitação orbital (estático-100 rpm). Na Figura 3 podem ser observados gráficos que representam a influência desses fatores na produção das substâncias que absorvem no comprimento de onda de 350 nm (absortividade máxima de azafilonas produzidas pela espécie *P. sclerotiorum*). As melhores condições de produção foram: sacarose 60 g/L, peptona 6 g/, tempo de bioprocesso de 30 dias e agitação orbital de 100 rpm.

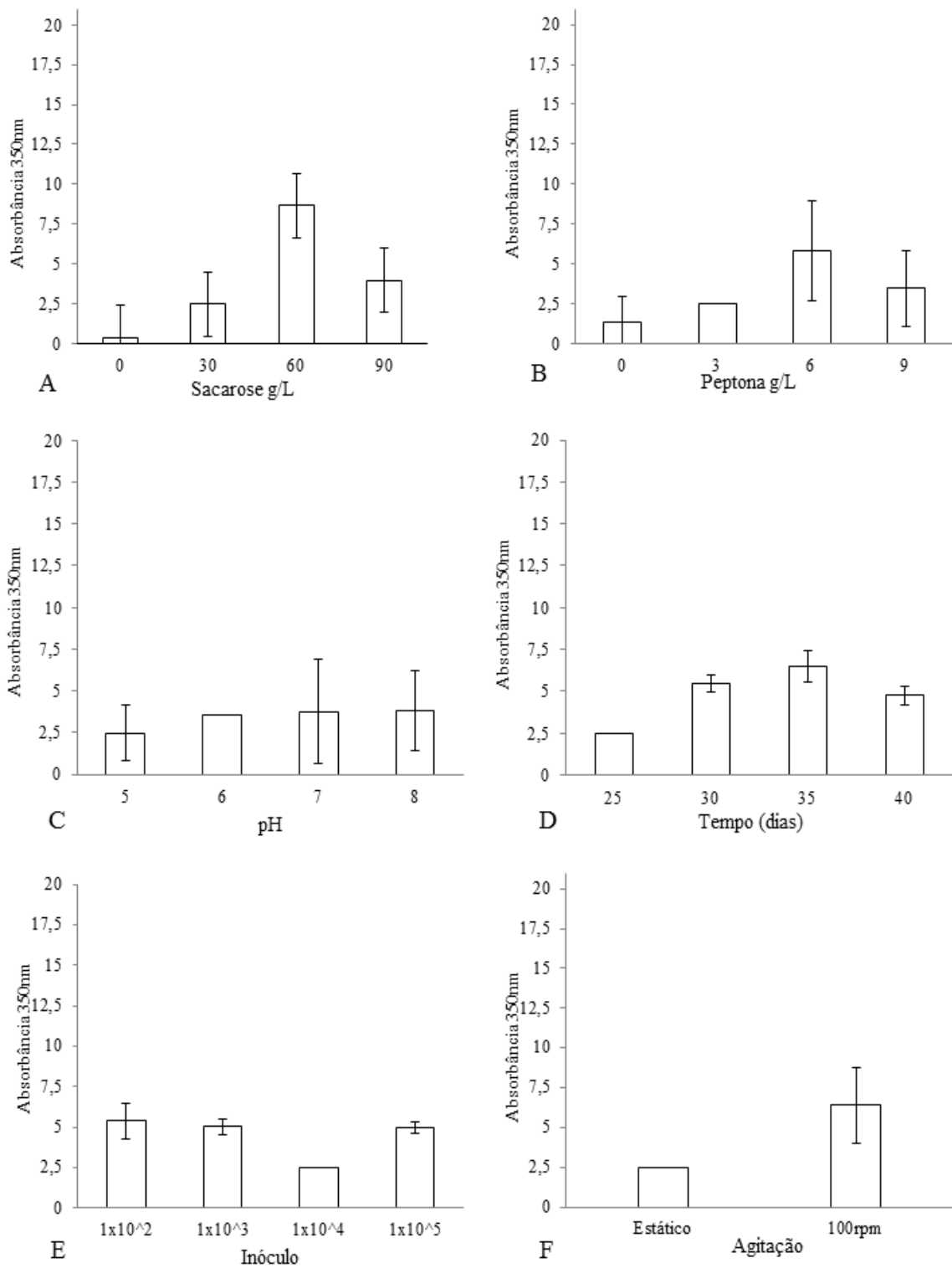


Figura 3: Influência dos fatores de concentração de sacarose (a), concentração de peptona (b), inóculo (c), pH (d), tempo (e) e agitação (f) em bioprocessamento submerso na produção de substâncias que absorvem no comprimento de onda de 350 nm por *P. sclerotiorum* 2AV2.

5.1.2 Bioprocesso em meio sólido

Ainda investigando bioprocessos, experimentos foram realizados para avaliar a influência dos parâmetros de bioprocessos para a produção de colorantes em meio sólido, contendo ágar. Para tanto, foram realizados experimentos univariados avaliando os fatores: concentração de sacarose (30-90 g/L), concentração de peptona (3-9 g/L), pH (5, 6, 7 e 8), tempo (20-35 dias) e tamanho do inóculo (1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 - 1×10^5 esporos/mL). Na Figura 4, podem ser observados gráficos que representam a influência desses fatores na produção desse colorante. Como pode ser observado, nos diferentes níveis dos fatores, a concentração de sacarose, concentração de peptona, pH e inóculo não apresentaram resultados significativamente diferentes. Quanto ao fator tempo, o período de 30 dias foi o mais adequado para a produção do colorante.

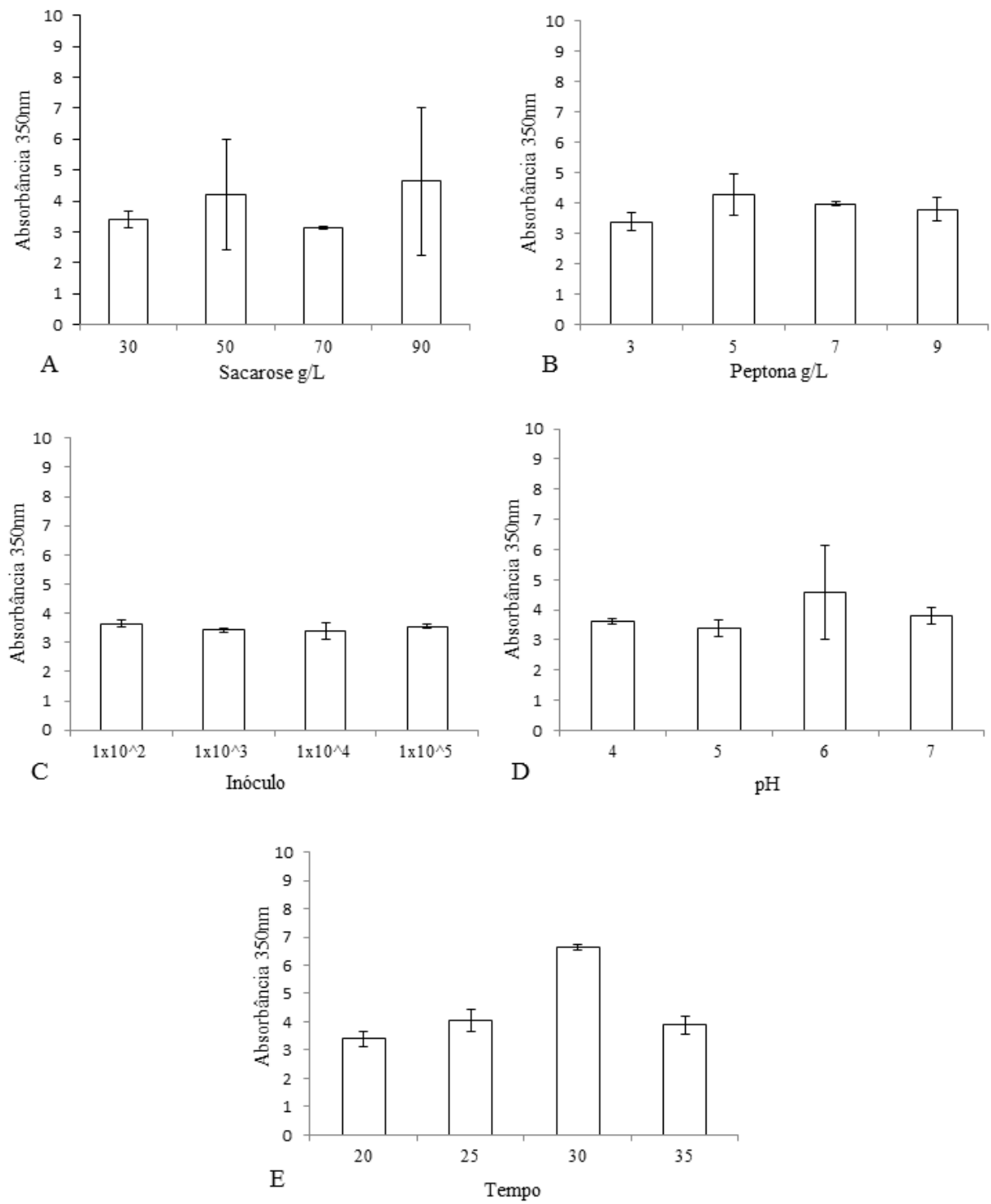


Figura 4: Influência dos fatores de concentração de sacarose (a), peptona (b), inóculo (c), pH (d) e tempo (e) em bioprocesso em meio sólido na produção do colorante por *P. sclerotiorum* 2AV2.

5.2 Isolamento de colorantes de *Penicillium sclerotiorum* 2AV2

5.2.1 Análise em RMN de ^1H e de ^{13}C da fração PS 4.2

Com a finalidade de identificar um colorante amarelo presente na fração PS 4.2, essa foi submetida a ensaios cromatográficos e espectrométricos. Nas condições experimentais, não foi possível identificar os colorantes da fração, no entanto, foi possível identificar a estrutura química do seu componente majoritário. Os parágrafos a seguir descrevem a identificação espectrométrica desse componente nessa fração.

As análises em RMN da fração PS 4.2 forneceram espectros unidimensionais e bidimensionais. O espectro de RMN de ^1H (Fig. 6 e 7, Tabela 2) mostrou sinais compatíveis com uma mistura de substâncias que demonstravam sinais característicos de ácidos graxos na amostra, sendo esses: a) sinais na região de δ 5,41-5,33 são típicos de hidrogênios olefínicos; b) o tripleto em δ 2,81 refere-se aos hidrogênios metilênicos presentes nas insaturações, típicas de ácidos graxos das séries n-6 e n-3; c) os sinais em δ 2,39 e 1,68 condizem com hidrogênios nas posições α e β carbonílicos, respectivamente e d) Os sinais em δ 2,10 e 1,33 são compatíveis com hidrogênios adjacentes a duas e três ligações das insaturações, respectivamente. A presença das metilas foram verificadas na região de δ 0,93-0,89.

O espectro de ^{13}C (Fig. 8 e 9, Tabela 2) exibiu deslocamentos químicos que corroboram com a presença de ácidos graxos. O sinal em δ 179,7 é típico de carboxila em δ 130,2; 130,0; 129,7 e 128,0 e são atribuídos aos carbonos olefínicos e na região entre δ 34,0-14,0 são referentes aos carbonos de grupamentos metilênicos e metílicos.

O mapa de contornos HSQC (Fig. 10) exibiu a correlação entre os hidrogênios em δ 5,41-5,33 com os carbonos olefínicos em δ 130,2; 130,0; 129,7 e 128,0. Os hidrogênios metilênicos em δ 2,81 correlacionam com o carbono em δ 25,6. Observou-se a correlação entre os hidrogênios α e β

carbonílicos em δ 2,39 e 1,68 com os carbonos em δ 34,0 e 24,9, respectivamente. Os hidrogênios em δ 2,10 e 1,33 exibiram correlação com os carbonos em δ 27,2 e 31,5, respectivamente, que são adjacentes às insaturações a duas e três ligações. Os hidrogênios metílicos em δ 0,93 correlacionam com o carbono em δ 14,3. Outras atribuições de sinais de ^1H e ^{13}C expostas na Tabela 2 foram baseadas no HSQC.

O mapa de contornos HMBC (Fig. 11, Tabela 2) apresenta as correlações entre os hidrogênios olefinicos em δ 5,41 com os carbonos adjacentes a duas ligações das insaturações em δ 27,2 (C-8 e C-14) e com os carbonos olefinicos δ 129,7 (C-10); 25,6 (C-11) e 128,0 (C-12). Os hidrogênios metilênicos em δ 2,81 (H-11) correlacionam com os carbonos em δ 130,0 (C-9) e 130,2 (C-13). Os hidrogênios α -carbonílicos (H-2) exibiram correlação com a carbonila em δ 179,7 e com os carbonos metilênicos em δ 27,2 (C-4); os β -carbonílicos (H-3) também correlacionam com a carbonila além dos grupos metilênicos em δ 34,0 (C-2) e 29,1 (C-5).

Os hidrogênios metilênicos correlacionam a uma ligação das insaturações em δ 2,10 (H-8 e H-14) e apresentam as seguintes correlações: H-8 com os carbonos em 29,9 (C-6) e 129,7 (C-10); H-14 com os carbonos em δ 31,5 (C-16) e 128,0 (C-12). Para os hidrogênios do metileno, duas ligações das insaturações em δ 1,33 (H-7 e H-15) foram observadas com as seguintes correlações: H-7 com os carbonos em δ 29,9 (C-6), 130,0 (C-9) e 129,7 (C-10); H-15 correlacionando com os carbonos em δ 130,2 e 22,9, atribuídos a C-13 e C-17, respectivamente. Os hidrogênios metílicos em δ 0,93 apresentaram correlação com o carbono em δ 31,5 (C-16).

A partir dos dados espectrais obtidos e com a comparação na literatura (WILLKER E LEIBFRITZ, 1998) foi possível identificar na fração PS 4.2 o ácido oleico (Fig. 5).

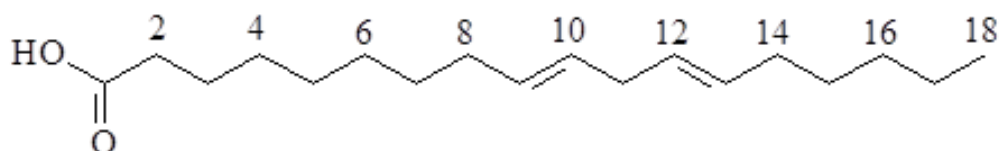
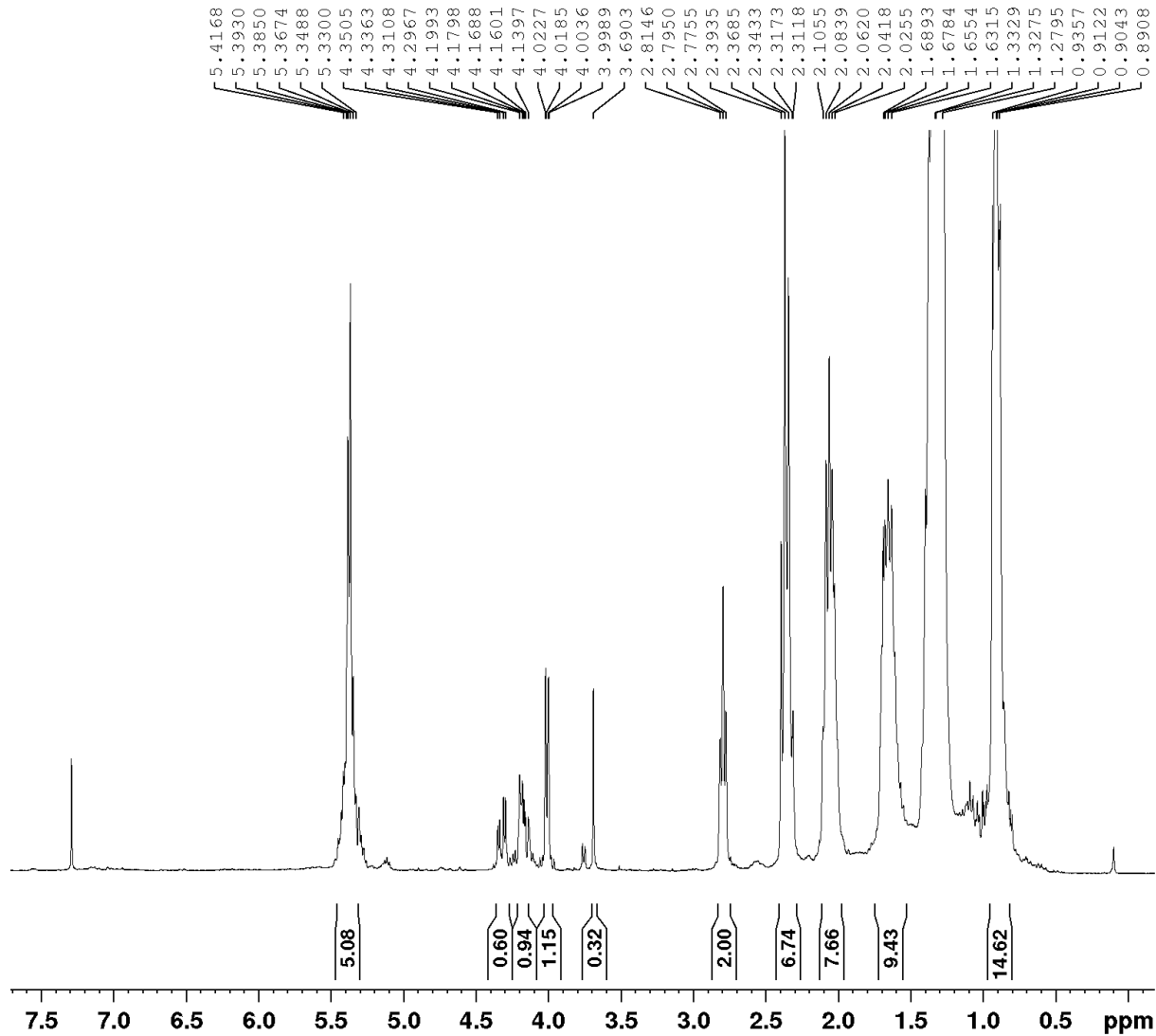


Figura 5: Estrutura química do ácido oleico

Posição	¹³ C	¹ H	¹³ C / ¹ H	HMBC
	δ (ppm) ^A	δ (ppm); mult. <i>J</i> (Hz) ^B	δ (ppm) ^{C/D} Willker & Leibfritz (1998)	
1	179,7			
2	34,0	2,39	34,4/2,32	C1 e C4
3	24,9	1,68	25,2/1,61	C1, C2 e C5
4	27,2	1,27		C6 e C7
5	29,1	1,33-1,27		C2 e C7
6	29,9	1,33-1,27		C4 e C8
7	31,5	1,33	31,8/1,30	C6, C9 e C10
8	27,2	2,10	27,5/2,06	C6 e C10
9	130,0	5,41		C10 e C11
10	129,7	5,41		C8 e C12
11	25,6	2,81; (t)	25,9/2,78	C9 e C13
12	128,0	5,41		C10 e C14
13	130,2	5,41		C11
14	27,2	2,10	27,5/2,06	C12 e C16
15	31,5	1,33	31,8/1,30	C13 e C17
16	31,5	1,32		C14 e C18
17	22,9	1,27		C16 e C18
18	14,0	0,93	14,1/0,89	C16

^A75 MHz, CDCl₃; ^B300 MHz, CDCl₃; ^C600 MHz, MeOD; ^D200 MHz, MeOD

Tabela 2: Dados espectroscópicos de ¹³C, ¹H e HBMC da fração PS 4.2 e ácido oleico.



Current Data Parameters
 NAME Márcia_PS_4.2
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20160108
 Time 15.22
 INSTRUM FOURIER300
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 64
 DS 0
 SWH 6103.516 Hz
 FIDRES 0.093132 Hz
 AQ 5.3687091 sec
 RG 2.818
 DW 81.920 usec
 DE 10.00 usec
 TE 294.5 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 SFO1 300.2019513 MHz
 NUC1 1H
 P1 7.64 usec
 PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.1999980 MHz
 WDW no
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Figura 6: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração PS4.2 proveniente de *P. sclerotiorum*

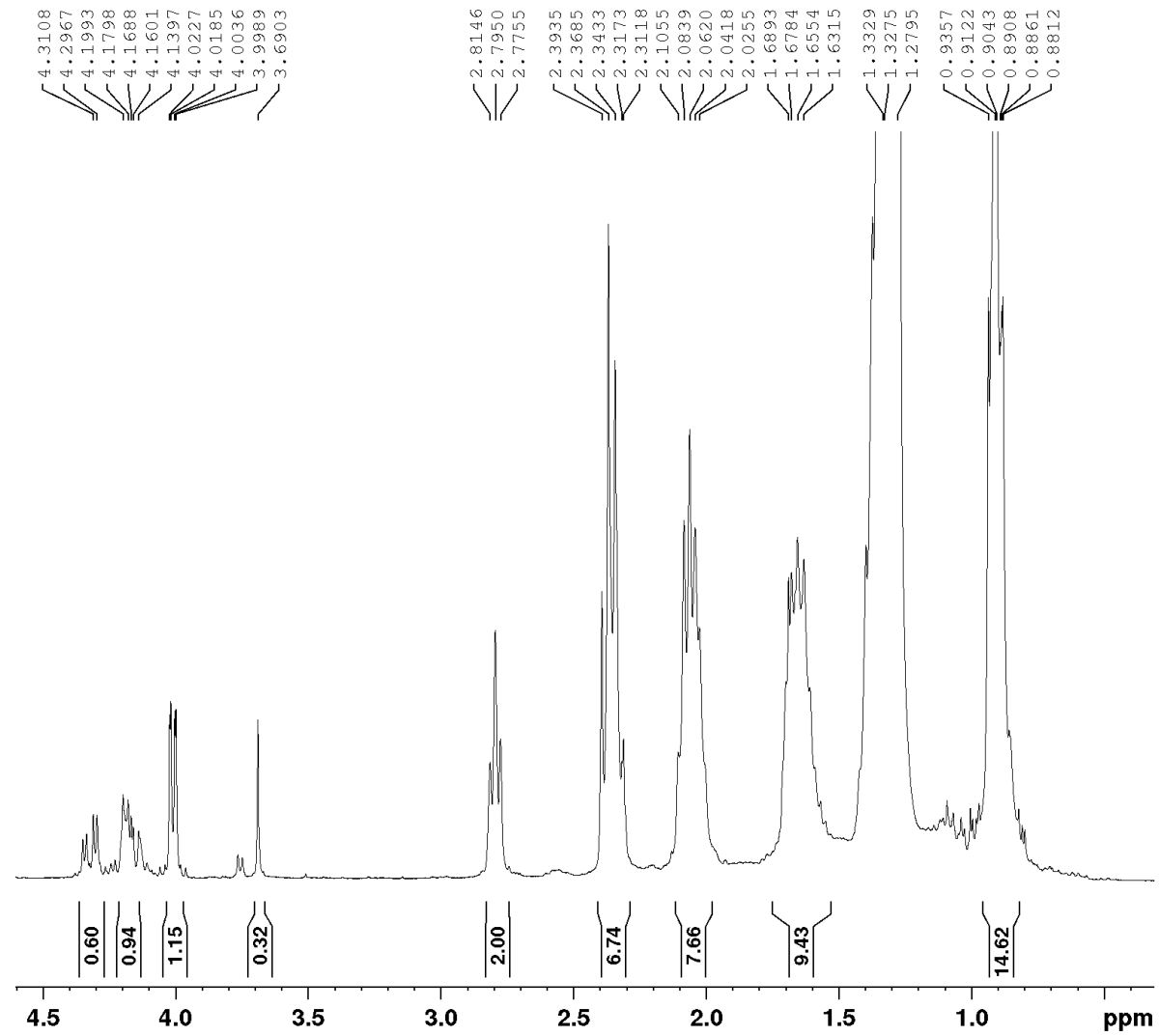


Figura 7: Expansão do espectro de RMN de ^1H (300MHz, CDCl_3) na região de 4,31-0,88ppm da fração PS 4.2

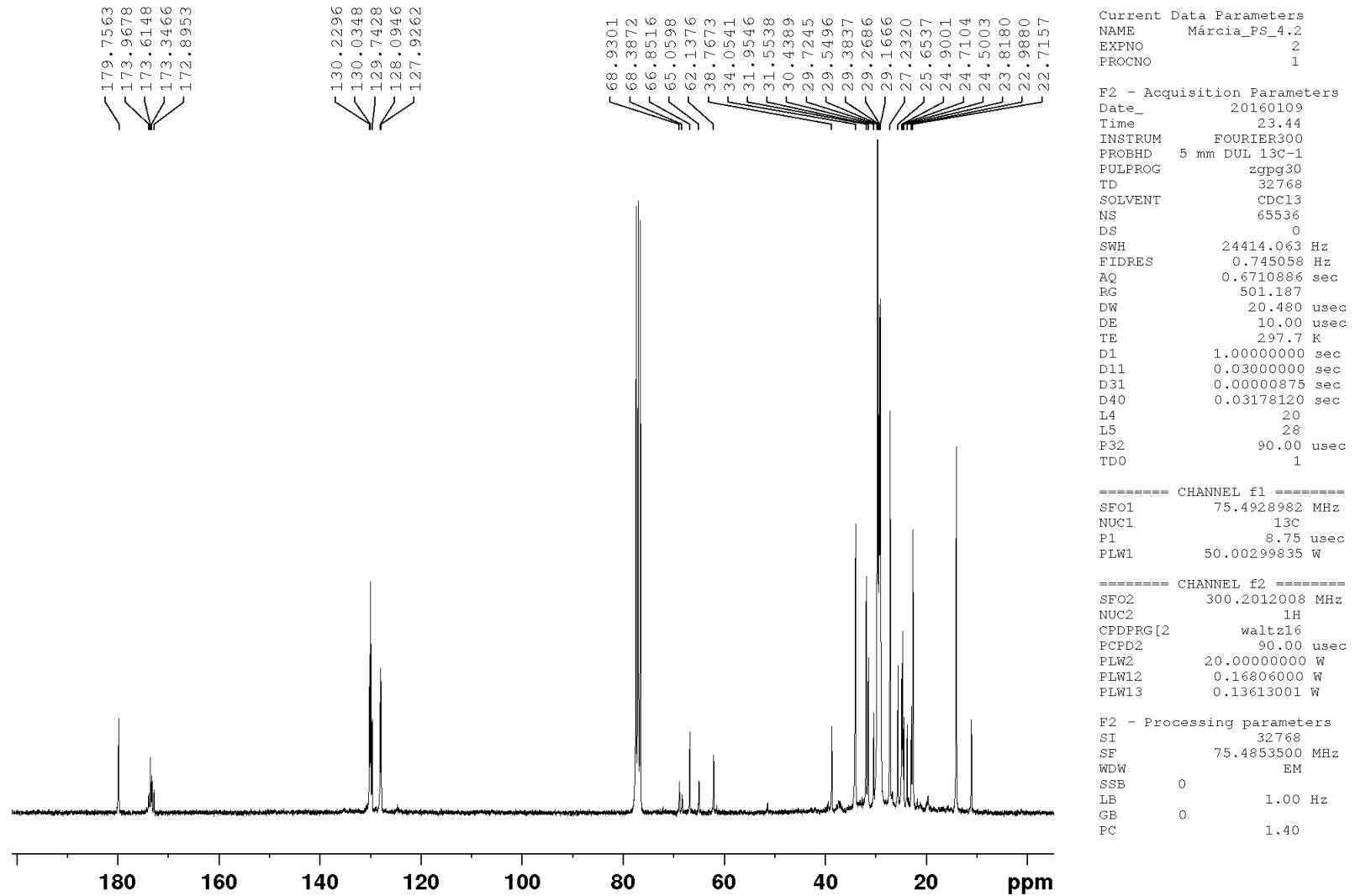


Figura 8: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da amostra PS4.2 proveniente de *P. sclerotiorum*.

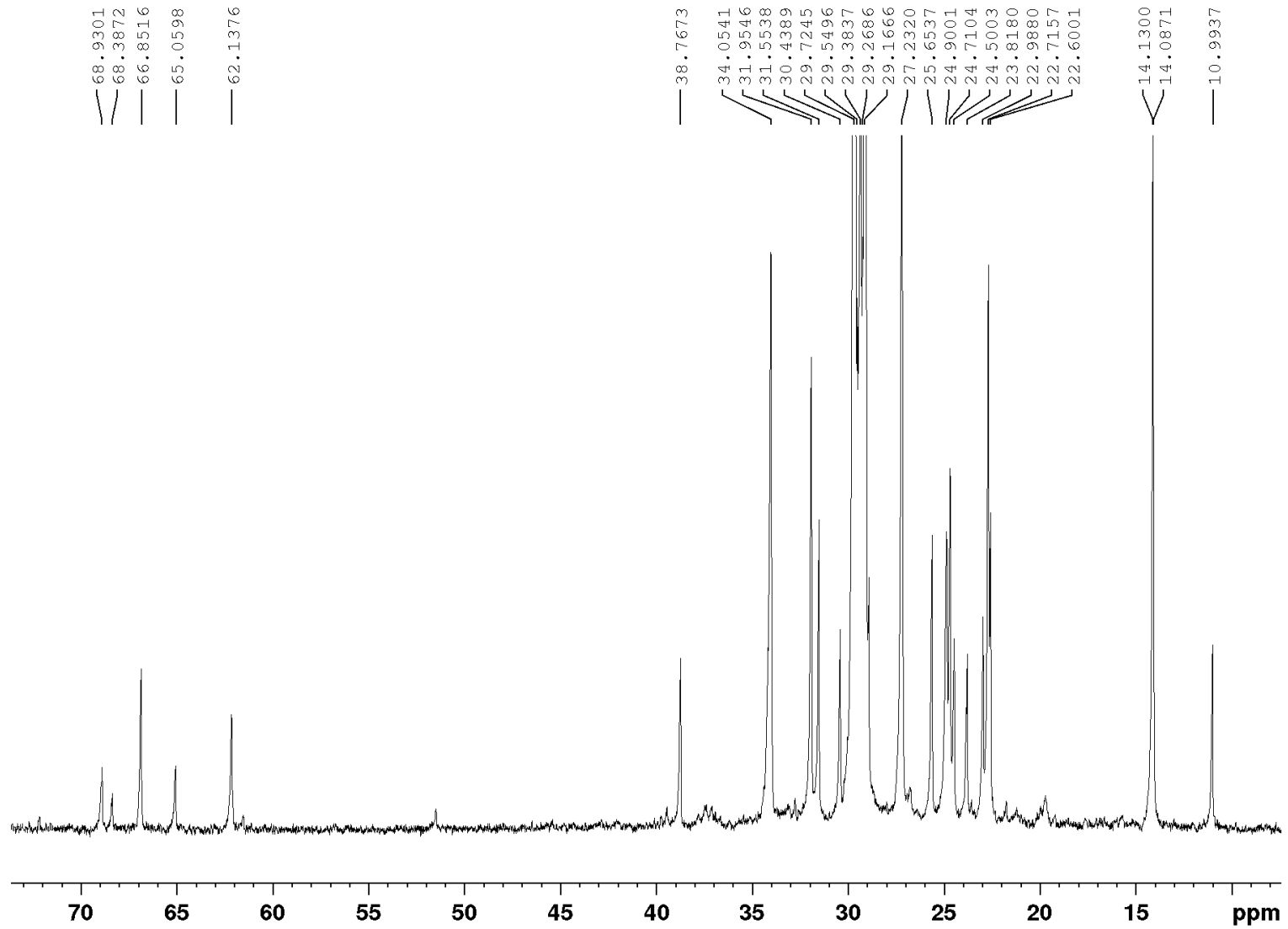


Figura 9: Expansão de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da amostra PS4. 2 proveniente de *P. sclerotiorum*.

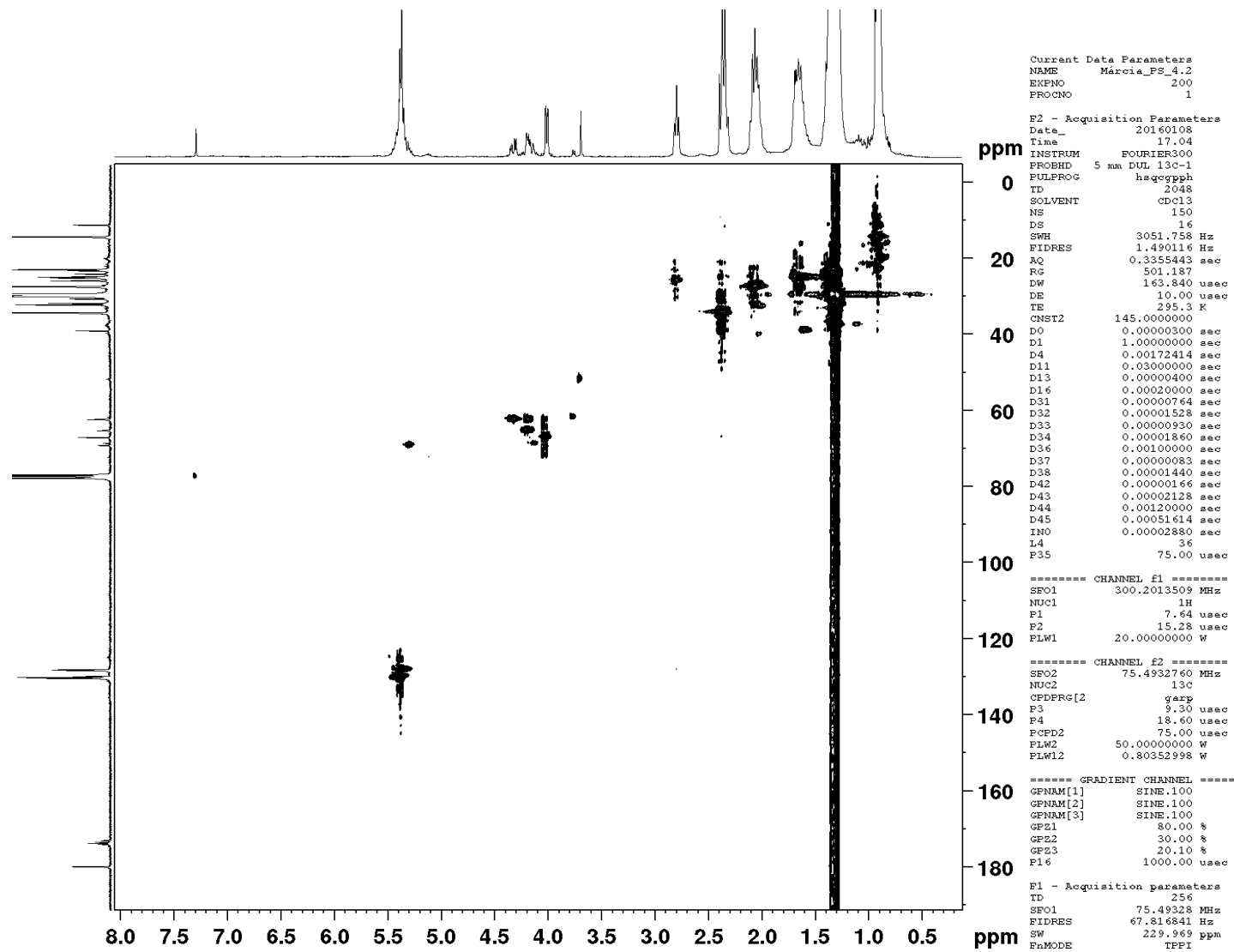


Figura 10: Mapa de contorno de HSQC (300/75 MHz, CDCl₃) da fração PS4.2

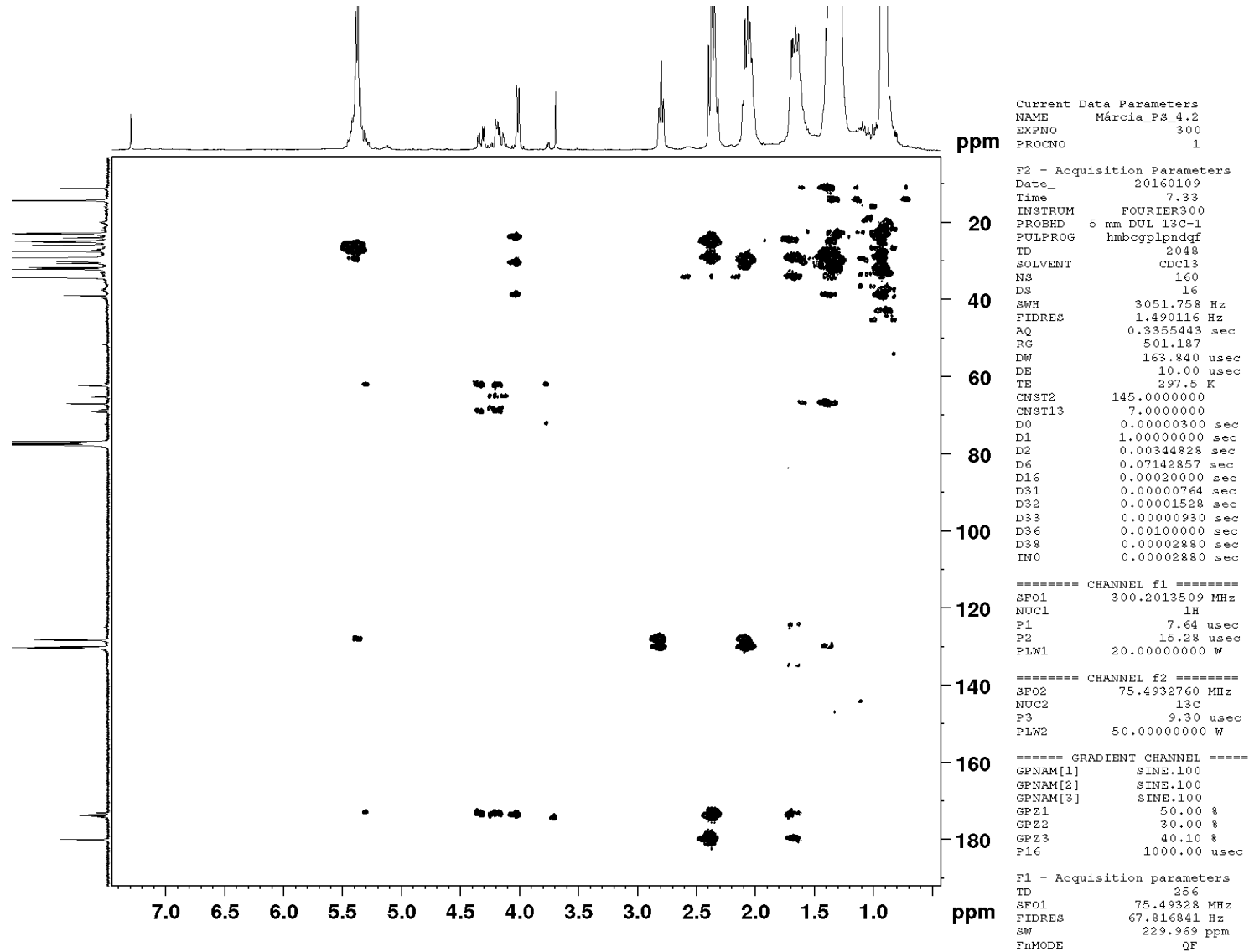


Figura 11: Mapa de contorno de HMBC (300/75 MHz, CDCl₃) da fração PS4.2

5.3 Bioensaios

5.3.1 Ensaio de Citotoxicidade

Foram realizados ensaios que avaliaram a CI_{50} (concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular) da esclerotiorina frente às linhagens tumorais SKMEL-19, SKMEL-28, MESA-DX e MRC-5 (não tumoral). Na Figura 12, observa-se a viabilidade celular das linhagens testadas frente a diferentes concentrações da esclerotiorina. A partir desses dados foi possível determinar a concentração inibitória capaz de provocar a morte ou a inativação metabólica de 50% das linhagens investigadas (Tabela 3). Nas condições experimentais, a esclerotiorina demonstrou citotoxicidade frente às linhagens tumorais estudadas ($CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$) e apresentou-se especialmente citotóxica frente a linhagem SKMEL- 28 ($CI_{50} = 7,081 \mu\text{g/mL}$). Deve-se destacar, ainda, que a esclerotiorina apresentou-se menos citotóxica do que a doxorrubicina frente a linhagem não tumoral (MRC-5).

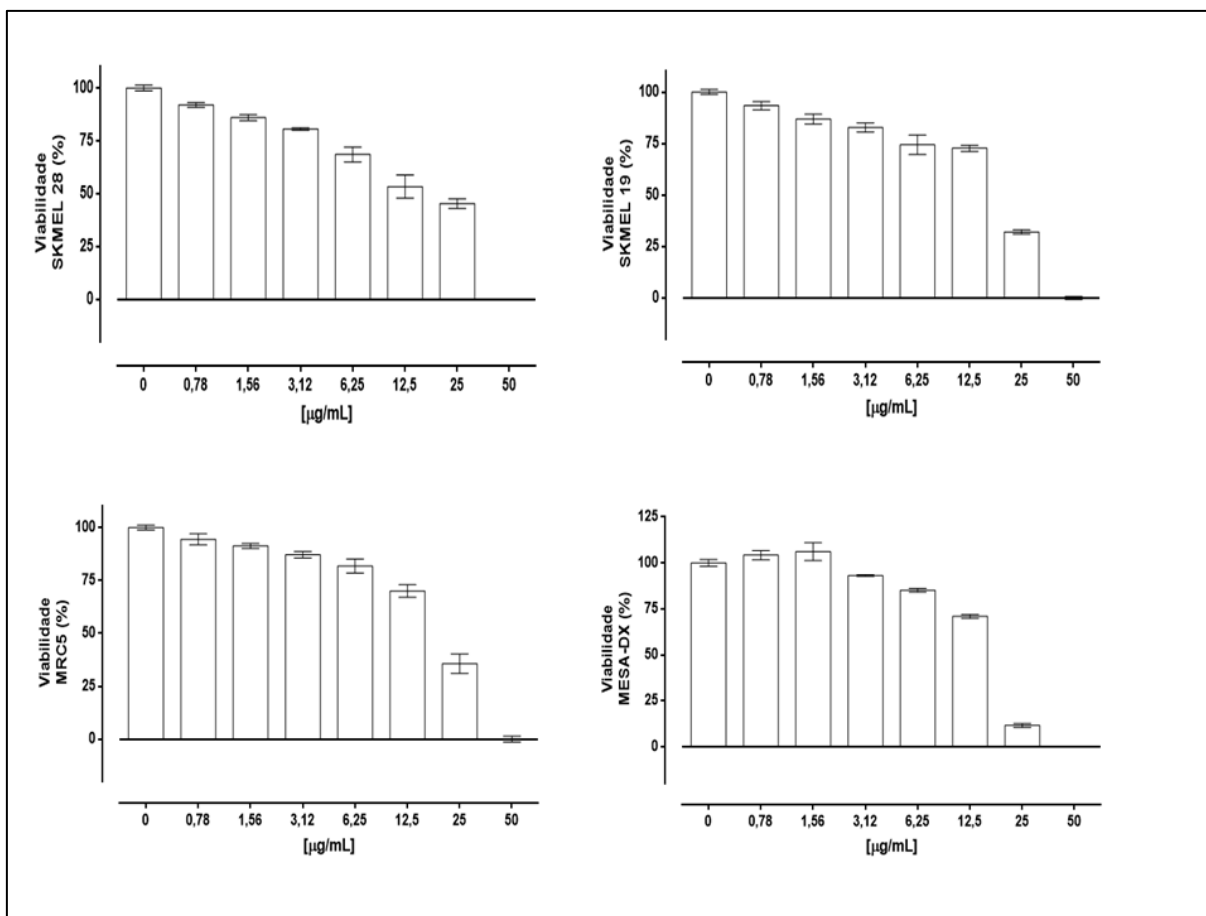


Figura 12: Análise do efeito dose-dependente da esclerotorina - Quantificação de morte celular pela SKMEL-28, SKMEL 19, MRC-5 e MESA-DX. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Tempo de tratamento de 72hs.

CI₅₀ (µg/mL) das linhagens

Compostos	SKMEL-19	SKMEL-28	MESA-DX	MRC-5
Esclerotorina	27,93 µg/mL	7,081 µg/mL	22,37 µg/mL	31,52 µg/mL
Doxorrubicina	0,608 µg/mL	2,956 µg/mL	5,364 µg/mL	1,351 µg/mL

Tabela 3: Concentrações inibitórias da esclerotorina frente a linhagens tumorais (SKMEL-19, SKMEL-28, MESA-DX) não tumoral (MRC-5). Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

5.3.2 Atividade antifúngica sobre *Cryptococcus neoformans*

Com a finalidade de investigar a atividade antifúngica da esclerotiorina, foi realizado ensaio em microdiluição que investigou a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dessa substância frente à linhagem de *C. neoformans* VNI PCN6. O colorante apresentou uma CIM de 75 µg/mL.

6. DISCUSSÃO

Os colorantes de origem fúngica tem despertado interesse por serem menos tóxicos e mais biodegradáveis que os corantes sintéticos (MAPARI *et al.*, 2010 e LOPES, 2011). O presente trabalho é importante, pois demonstrou a influência das condições dos bioprocessos na produção de colorantes, realizou o fracionamento e a identificação do componente majoritário de uma fração amarela (PS-4.2) e realizou bioensaios com o colorante esclerotiorina.

No presente trabalho, os experimentos univariados demonstraram que os fatores sacarose, peptona, tempo do bioprocesso e agitação orbital influenciaram na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* nos bioprocessos submersos. Esses resultados eram esperados, uma vez que todos esses fatores estudados são usualmente investigados na otimização de bioprocessos (PANDEY, 2003). A sacarose, na concentração de 60-90 g/L, foi correlacionada a elevada produção dos colorantes sendo que, essa concentração de substrato pode ser necessária para uma maior viabilidade do organismo, situação necessária para a produção de metabólitos secundários como os colorantes. A peptona, nas concentrações entre 3-9 g/L, promoveu a produção dos colorantes. Fontes de nitrogênio são apresentadas na literatura (GUNASEKARAN E POORNIAMMAL, 2008; SUBHASREE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014) como fundamentais para a biossíntese de colorantes. O tempo de bioprocesso de 30-35 dias foi necessário para a produção máxima dos colorantes demonstrando que esses últimos são metabólitos secundários associados com a fase estacionária e de declínio da espécie *P. sclerotiorum*.

Santos - Ebumina (2013) estudou a produção de colorantes por *P. purpurogenum* e dentre as fontes de carbono testadas, os melhores resultados obtidos foram com a sacarose. Assim também Cho *et al* (2002) estudaram a influência de 11 fontes de carbono na produção de colorantes vermelhos por cultivo submerso de *Paecilomyces sinclairii* e os resultados demonstraram que a sacarose foi favorável ao crescimento micelial. A síntese de colorante

utilizando a fonte nitrogenada peptona foi superior na concentração de 6 g/L. Gunasekaram e Poorniammal (2008) investigaram que a peptona, em cultivo submerso de *Penicillium sp.*, na produção de colorantes, teve um efeito positivo no rendimento. Assim, os resultados desses autores são similares aos apresentados neste trabalho, uma vez que o micro-organismo apresentou um bom rendimento na síntese de colorantes.

Nos ensaios realizados em meio sólido (contendo ágar), observou-se que os fatores investigados, nos diferentes níveis, não demonstraram significativa influência na produção de colorantes (Figura 4). Esse resultado difere dos resultados observados nos bioprocessos submersos (Figura 3) onde os fatores de bioprocessos apresentaram significativa influência. Uma explicação para essa diferença pode estar correlacionada as diferentes necessidades nutricionais dos fungos nessas duas modalidades de bioprocessos. Mais estudos serão necessários para elucidar esses achados.

Os colorantes produzidos por *P. esclerotiorum* foram extraídos e submetidos a fracionamento que resultaram na fração PS 4.2, sendo que, a caracterização química realizada demonstrou que essa fração era majoritariamente composta por ácido oleico. Os ácidos graxos com dezoito ou mais átomos de carbono e com mais de duas ligações duplas são sintetizados por fungos, algas, bactérias (ALMEIDA, 2007) e podem compreender até 88% da fração lipídica produzida por fungos. Nesses últimos, os ácidos graxos insaturados (especialmente oleico e linoleico) predominam sobre saturados, sendo comum a ocorrência de ácidos graxos livres (RUEGGER, 2001). Estudos anteriores demonstram o potencial de fungos do gênero *Penicillium* em produzir ácidos graxos poli-insaturados (MIOSO *et al.*, 2014 e PACHECO, 2009). Provavelmente, a substância responsável pela cor amarela da fração PS4. 2 foi o próprio ácido oléico ou, ainda, pode ser que o colorante responsável pela cor estava em quantidade minoritária.

A esclerotiorina apresentou atividade citotóxica frente a todas as linhagens tumorais estudadas e apresentou-se especialmente citotóxica frente à linhagem SKMEL-28. Mohamed

(2012) relatou que substâncias que apresentam CI_{50} inferiores a 30 $\mu\text{g/L}$ podem ser consideradas como promissoras para o desenvolvimento de drogas antineoplásicas. Estudos anteriores já haviam demonstrado o potencial da esclerotiorina como antiproliferativa e indutora de apoptose nas linhagens HCT-116 (câncer do cólon) e Hep3B (carcinoma hepatocelular) (CHIDANANDA *et al.*, 2008; GIRIDHARAN *et al.*, 2012). O presente trabalho foi o primeiro a demonstrar o potencial da esclerotiorina frente às linhagens de células tumorais investigadas.

A esclerotiorina demonstrou atividade antifúngica frente à linhagem *C. neoformans* genótipo VNI linhagem PCN6. A Criptococose é uma micose sistêmica causada por fungos do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (MORAES *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2009). Suas formas clínicas vão desde assintomática até disseminada, acometendo principalmente o sistema nervoso central (meningite). Os principais acometidos por essa doença são os imunocomprometidos, em especial os HIV/AIDS (GULLO *et al.*, 2013). Atualmente, o tratamento dessa doença é feito utilizando o antifúngico Anfotericina, no entanto, essa droga possui muitos efeitos colaterais e é nefrotóxica. Assim, a descoberta da esclerotiorina como substância ativa frente a esse micro-organismo é mais um resultado importante do presente trabalho. A atividade antifúngica da esclerotiorina já havia sido demonstrada frente à *Candida albicans* (LUCAS *et al.*, 2007; CHIDANANDA, 2008; ARUNPANICHLERT *et al.*, 2010) o presente resultado ressalta o potencial antifúngico dessa substância.

O presente estudo apresentou algumas limitações: a) a avaliação da produção de colorantes nos bioprocessos foi feita por espectrofotometria no comprimento de onda de 350 nm, isso devido à absorvidade máxima das azafilonas produzidas por *P. sclerotiorum*. Essa abordagem metodológica é limitada pois não quantificou os colorantes com absorvidade máxima em outros comprimentos de onda e, ainda, a quantificação pode sofrer interferência de substâncias incolores mas que absorvem nesse mesmo comprimento de onda. No entanto, deve ser dito que, as absorvidades observadas sempre demonstraram correlação com a intensidade de cor dos

colorantes vermelhos observados no cultivo b) nas condições experimentais, não foi possível identificar novos colorantes de *P. sclerotiorum*, apesar das várias frações coloridas, essas não possuíam quantidade suficiente para suas determinações estruturais.

Em síntese, o presente trabalho discutiu fatores envolvidos nos bioprocessos para produção de colorantes pelo fungo *P. sclerotiorum*, demonstrou a produção de ácido oleico por esse isolado e demonstrou o potencial antitumoral da esclerotiorina frente a novas linhagens tumorais e antifúngico frente a *C. neoformans*.

7. CONCLUSÃO

- Nas condições experimentais, os fatores de bioprocessos, concentração de sacarose, concentração de peptona, tempo e agitação apresentaram influência na produção de colorantes no bioprocessamento submerso. No bioprocessamento em meio sólido, utilizando ágar, somente o fator tempo apresentou influência.
- Não foi possível realizar o isolamento de colorantes utilizando as metodologias investigadas. Ácido oleico pôde ser identificado durante a investigação das frações coloridas.
- Esclerotiorina demonstrou atividade antitumoral frente às linhagens tumorais SKMEL-19, SKMEL-28 e MESA-DX. Em acréscimo, pode-se demonstrar atividade antifúngica da esclerotiorina frente à *Cryptococcus neoformans*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.F. Cultivo de *Mucor circinelloides* em substratos líquido e sólido para a produção de ácidos graxos insaturados. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.

ARUNPANICHLERT, J; RUKACHAISIRIKUL, V; SUKPONDMA, Y; PHONGPAICHIT, S; TEWTRAKUL, S; RUNGJINDAMAI, N; SAKAYAROJ, J. Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v. 58, n.8, p. 1033-1036, 2010.

ANVISA. Legislação/Alimentos. Disponível em <[http: www.anvisa.com.br](http://www.anvisa.com.br)>2007.

BEYMA, J.F.H. van. *Penicillium sclerotiorum* nov. spec. *Centrablatt für Bakteriologie, Parastenkunde und Infektionskrankheiten* Abt. II, v. 96, p. 481–491, 1937.

CARVALHO, J.C. Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido. 90 pág. Tese de Doutorado- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CARVALHO, P. O.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G.A. Kinetic Properties and Enantioselectivity of the Lipases Produced by Four *Aspergillus* Species. *Food Biotechnol*, v.19, p.183–192, 2005.

CELESTINO, J.R; CARVALHO, L.E.; 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, p. 569-575, 2014.

CHAÎNEAU, C.H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of the Total Environment*, v. 227, p. 237-247, 1999.

CHIDANANDA, C.; RAO, L.J.M.; SATTUR, A.P. Sclerotiorin, from *Penicillium frequentans*, a potente inhibitor of aldose reductase. *Biotechnol Lett*, v. 28, p. 1633-1636, 2006.

CHIDANANDA, C.; SATTUR, A.P. Sclerotiorin, a novel inhibitor of lipoxygenase from *Penicillium frequentans*. *J Agric FoodChem*, v. 55, p. 2879-2883, 2007.

CHIDANANDA, C.; Studies on microbial production of lipoxygenase inhibitor. University of Mysore, 2008.

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. *J. Biotechnol.*, v. 95, p. 13-23, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27 – A3 (28). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.

CURTIN, T.P.; REILLY, J. Sclerotiorine, C₂₀H₂₀O₅Cl, a chlorine-containing metabolic product of *Penicillium sclerotiorum* van Beyma. *Biochemical Journal*, v. 34, p. 1418–1421, 1940.

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

DUFOSSE, L. Microbial production of food grade pigments. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 44, p. 313-321, 2006.

ELOY, J.O.; OLIVEIRA, E.C.V.; MOROTTA-OLIVEIRA, S.S.; SARAIVA, J.; MARCHETTI, J.M. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido úrsólico em dispersões sólidas. *Química Nova*, v.35, n.5, 2012.

GIRIDHARAN, P.; VEREKAR, S.A.; KHANNA, A., MISHRA, P.D.; DESHMUKH, S.K. Anticancer activity of sclerotiorin, isolated from an endophytic fungus *Cephalotheca faveolata* Yaguchi, Nishim. & Udagawa. *Indian J Exp Biol*, v. 50, p. 464–8, 2012.

GOMES, D.C. Produção de esclerotiorina por *P. sclerotiorum* e obtenção de derivados com aplicação potencial em alimentos. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

GONÇALVES, R.C.R. Estudo da estrutura e da atividade biológica do pigmento melanina produzido pelo fungo *Aspergillus nidulans*. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista – Araraquara, 2008.

GOUVEIA, L.; NOBRE, B.P.; MARCELO, F.M.; MREJEN, S.; CARDOSO, M.T.; PALAVRA, A.F.; MENDES, R.L. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgal with supercritical CO₂. *Food Chemistry*, v.101, p. 717-723, n^o 2, 2007.

GULLO, F.P.; ROSSI, S.A.; SARDI, J.C.O.; TEODORO, V.L.I.; MENDES-GIANNINI.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2013.

GUNASEKARAN, S; POORNIAMMAL, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. Under submerged cultivation. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 12, p. 1894-1898, 2008.

HAJJAJ, H.; BLANC, P. J.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; LOUBIERE, P. Kinetics analysis of red pigment and citrinina production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme Microbial Technology*. v.27, p.619-625, 2000.

HAJJAJ, H; FRANCOIS, J; GOMA, G; BLANC, P. Effect of amino acids on red pigments and citrinin production in *Monascus ruber*. *Journal of Food Science*, v. 77, n. 3, p. 156-159, 2012.

HERNÁNDEZ-RIVERA, J.S., MÉNDEZ-ZAVALA, A., PÉREZ-BERÚMEN, C., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. Culture Conditions to Improve the Red Pigment Production by *Penicillium purpurogenum* GH2. In: Soto-Cruz, O., Angel, P.M., Gallegos-Infante, A., Rodríguez-Herrera, R. (Eds.), *Advance in Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries*. Mex Asoc Food Sci Editions, Saltillo, Mexico, p.108-112, 2008.

HORISAWA, S.; SAKUMA, Y.; DOI, S. Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. *Journal of Wood Science*, v. 55, p.133-138, 2009.

HUANG, Z.; ZHANG, S.; XU, YANG.; LI, L.; LI, Y. Structural characterization of two new orange pigments with strong yellow fluorescence. *Phytochemistry Letters*, v.10, p.140-144, 2014.

JALMI, P; BODKE, P; WAHIDULLAH, S; RAGHUKUMAR, S. The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 505-512, 2012.

KNOB, A. Complexo xilanolítico de *Penicillium sclerotiorum*: produção, purificação e caracterização de xilanases e de β -xilosidases. Tese de Doutorado (Programa de pós graduação em ciências biológicas- microbiologia aplicada), Universidade Estadual Paulista, 2009.

KONGRUANG, S. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v.38, p. 93-9, 2011.

LATHA, B.V.; JEEVARATNAM, K. Purification and Characterization of the pigments from *Rhodotorula glutinis*- DFR-PDY isolated from natural source. *Global Journal of Biotechnology Biochemistry*, v. 5, p. 166-174, 2010.

LOPES, F.C. Produção e Análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 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 Eco-Friendly Alternative. *Appl Biochem Biotechnol*. 171:616–625, 2013.

LUCAS, E; MACHADO, Y; FERREIRA, A; DOLABELLA, L; TAKAHASHI, J. Improved production of pharmacologically-active sclerotiorin by *Penicillium sclerotiorum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 9, n. 4, p. 365-371, 2010.

LUCAS, E.M.F., 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. *Brazilian Journal of Microbiology*, v 38, p.785-789, 2007.

MACCURTIN, T., REILLY, J. S. Sclerotiorine, a chlorinated metabolic product of *Penicillium sclerotiorum*, Van Beyma. *J. Biochem J*, v. 34, p. 1419-1421, 1940.

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.; FRIVASD, 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, p.231–238, 2005.

MAPARI, S.A.S., HANSEN, M.E., MEYER, A.S., THRANE, U. Computerized screening for novel producers of *Monascus*-like food pigments in *Penicillium* Species. *J Agri. Food Chem.* v.56, p. 9981-9989, 2008.

MAPARI, S; THRANE, U; MEYER, A. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants. *Trends in Biotechnology*, v. 28, p. 300-307, n°6, 2010.

MEINICKE, R.M. Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando glicerol como cultivo submerso. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina- Florianópolis, 2008.

MENDONÇA, J. N. Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

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

MIOSO, R.; MARANTE, F.J.T.; LAGUNA, I.H.B.; GONZÁLES, J.E.G.; RODRIGUÉZ, J.J.S. Biomolecules produced in liquid-state fermentation by a marine-derived fungus, *Penicillium roqueforti*. *Química Nova*, v.37, n.2, São Paulo, 2014.

MÉNDEZ, A; PÉREZ, C; MONTAÑÉZ, J; MARTÍNEZ, G; AGUILAR, C. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, v. 12, n. 12, p. 961-968, 2011.

MOHAMED, H. F. Molecular analysis and anticancer properties of two identified isolates, *Fusarium solani* and *Emericella nidulans* isolated from Wady El- Natrom soil in Egypt against Caco-2 (ATCC) cell line. *Asian Pac J Trop Biomed* v. 11, p. 863-869, 2012.

MORAES, A.M.L.; PAES, R.A.; HOLANDA, V.L. Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde, v. 4, p. 417-421, 2009.

MORITZ, D.E. Produção do pigmento *Monascus* por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso. Tese de doutorado em Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

NAGPAL, N; MUNJAL, N; CHATTERJEE, S. Microbial Pigments with Health Benefits - A Mini Review. *Trends Biosci*, v. 4, p. 157-160, 2011.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*, n°. 204, p. 205-208, 1997.

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, 2010.

PACHECO, F.L.C. Identificação bacteriana por derivação de ácidos graxos extraídos de células íntegras. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos. Universidade de São Paulo, 2009.

PAIRET, L.; WRIGLEY, S.K.; CHETLAND, I.; REYNOLDS, E.E.; HAYES, M.A.; HOLLOWAY, J.; AINSWORTH, A.M.; KATZER, W.; CHENG, X-M.; HUPE, D.J.; CHARLTON, P.; DOHERTY, A.M. Azaphilones with endothelin receptor binding activity produced by *Penicillium sclerotiorum*: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, v. 48, p. 913-922, n°9, 1995.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 14, p. 81–84, 2003.

PARK, B.J.; WANNEMUERHLER, K.A.; MARSTON, B.J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T.M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis HIV/AIDS, p. 525–30, 2009.

PETIT, P; LUCAS, E; ABREU, L; PFENNING, L; TAKAHASHI, J. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. Isolated from Brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 12, n. 4, p. 1-9, 2009.

PITT, J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. 3 ed. North Ryde: Food Science Australia, 2000.

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

QIU, M; RUIHENG, X; SHI, Y; CHEN, H. Isolation and Identification of fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 26, p. 993-8, 2010.

RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHUSELVAM, M. Microbial Biotechnology: Rapid Advances in an area of massive impact. *Advanced Biotech.* p. 19-25, 2008.

RAINA, S.; ODELL, MARK.; KESHAVARZ, T. Quorum sensing as a method for improving sclerotin production in *Penicillium sclerotiorum*. *Journal of Biotechnology*, v. 148, p. 91-98, 2010.

RENHE, I; VOLP, A; VIDIGAL, J; STRINGHETA, P. *Monascus* na nutrição e saúde. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 17, p. 337-343, n. 3, 2006.

RUEGGER, M.J.S. Atividade enzimática e produção de γ -linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins, Sp. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, 2001.

SAMSON, R; YILMAZ, N; HOUBRAKEN, J; SPIERENBURG, H; SEIFERT, K; PETERSON, S; VARGA, J; FRISVAD, J. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, v. 70, n.1, p. 159-183, 2011.

SANTOS- EBINUMA, V.C. Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, 2013.

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

SUBHASREE, R.S.; DINESH BABU, P.; VIDYALAKSHMI, R.; CHANDRA MOHAN, V. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Stimulation of Pigment Production by *Monascus purpureus* on Jackfruit Seeds. International Journal of Microbiological Research, v. 2, p. 184-187, 2011.

TAKAHASHI, J; CASTRO, M; SOUZA, G; LUCAS, E; BRACARENSE, A; ABREU, L; MARRIEL, I; OLIVEIRA, M; FLOREANO, M; OLIVEIRA, T. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. Journal de Mycologie Médicale, v. 18, n. 4, p. 198-204, 2008.

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

TAKAHASHI, J; LUCAS, E. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. Química Nova, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TEIXEIRA, M; MARTINS, M; SILVA, J; KIRSCH, L; FERNANDES, O; CARNEIRO, A; CONTI, R; DURÁN, N. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, v. 6, n. 3, p. 300-311, 2011.

TICHOTA, D.M.; LOPES, F.C.; RIOS, A.O.; BRANDELLI, A. Produção e Identificação por *Monascus purpureus* cultivado com resíduos agroindustriais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Ciência e Tecnologia de alimentos, 2010.

VALDUGA, E; TATSCH, P; TIGGEMANN, L; TREICHEL, H; TONIAZZO, G; ZENI, J; DI LUCCIO, M. Produção de carotenóides: micro-organismos como fonte de pigmentos naturais. Química Nova, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VENDRUSCOLO, F. Produção de pigmento vermelho a partir de pigmento laranja produzido por *Monascus ruber* CCT 3802. 272f. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

WACULICZ-ANDRADE, C.E. Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas cítricas e da vegetação espontânea. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná - Curitiba, 2009.

WENG, S.H.; SU, N.W.; CHOONG, Y.M.; LEE, M.H. HPLC/ calorimetry combination method for quantitative analyses of sclerotiorin produced by *Penicillium sclerotiorum*. Journal of Food and Drug Analysis, v. 12, n° 3 p. 199-204, 2004.

WILLKER, W.; LEIBFRITZ, D. Assignment of mono-and polyunsaturated fatty acids in lipids of tissues and body fluids. Magnetic Resonance in Chemistry, v. 36, n°. 79-84, 1998.

ZANETTE, G.F. Pigmentos naturais produzidos por Fungos Filamentosos Isolados de *Theobroma grandiflorum* (Willd.Ex Spreng.) Schum. (cupuaçu). Tese de doutorado. Universidade Federal do Amazonas – Manaus, 2013.

ZHANG, X.W.; WANG, J.H.; CHEN, M.H.; WANG, C.L. Effect of Nitrogen Sources on Production and Photostability of *Monascus* Pigments in Liquid Fermentation. IERI Procedia, v.5, p.344-350, 2013.

APÊNDICE A: Meio Ágar Batata Dextrose

- Batata inglesa - 140g
- Dextrose - 20g
- Ágar - 20g
- Cloranfenicol - 250g
- Água Destilada - q.s.p. 1000 mL

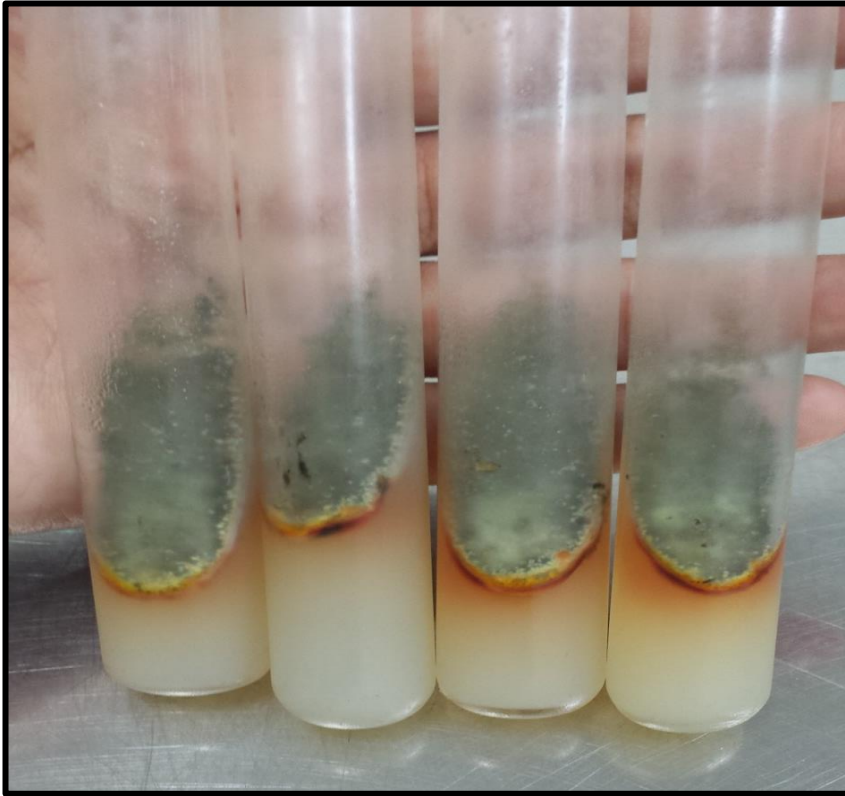
Técnica: Descascar a batata e pesar 140g. Cortar em fatias bem finas, juntar 500 mL de água destilada e deixar ferver por cerca de 5 minutos. Filtrar a infusão, adicionar o ágar, a dextrose e o cloranfenicol. Completar o volume para 1000 mL. Esterilizar por 20 minutos a 130° C.

APÊNDICE B: Caldo Czapeck

- Peptona- 3g
- Fosfato monoácido de potássio -1g
- Sulfato de magnésio - 0,5g
- Cloreto de potássio - 0,5g
- Sulfato ferroso - 0,01g
- Sacarose - 30g
- Cloranfenicol -250g
- Água destilada - q.s.p. 1000 mL

Técnica: Dissolver o ágar em 500 mL de água destilada. Aquecer até a completa dissolução. Adicionar os sais e agitar. Acrescentar a sacarose e o cloranfenicol. Completar o volume para 1000 mL. Homogeneizar com bastão de vidro. Esterilizar por 20 minutos a 130°C.

APÊNDICE C: Cultivo de *Penicillium sclerotiorum* 2AV2 em tubo



APÊNDICE D: Bioprocesso submerso



APÊNDICE E: Bioprocesso em meio sólido

