



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Pigmentos Naturais Produzidos por Fungos Filamentosos
Isolados de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.)
Schum. (cupuaçu)

GABRIELA FERREIRA ZANETTE, MsC.

Manaus/Amazonas

Junho – 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GABRIELA FERREIRA ZANETTE

Pigmentos Naturais Produzidos por Fungos Filamentosos
Isolados de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.)
Schum. (cupuaçu)

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Conservação e Uso de Recursos Genéticos Microbianos da Amazônia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ ODAIR PEREIRA

Manaus/Amazonas

Junho – 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Odair Pereira

Dr^a. Cecilia Veronica Nunez

Dr. João Lúcio de Azevedo

Prof^a. Dr^a. Doriane Picanço Rodrigues

Dr. Aldo Rodrigues de Lima Procópio

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela força e oportunidade de estar completando mais esta etapa do meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional de Biotecnologia** por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa de estudos.

Ao **Profº. Drº. José Odair Pereira**, pela valiosa orientação, apoio, paciência, amizade, e incentivo em todas as etapas deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por todos os ensinamentos que contribuíram para a minha formação, em especial a **Profª. Drª. Doriane Picanço Rodrigues**, pelas sugestões, conselhos e amizade.

À **Profª. Drª. Cecília Verônica Nunez**, por gentilmente ceder espaço no Laboratório de Fitoquímica (INPA) para a realização das análises bioquímicas.

Ao meu melhor amigo e marido **Ivan Fernandes Vieira**, por todo o carinho, paciência, discussões e divagações, apoio e presença constante.

À minha família, **Agenor, Neide e Jeruza**, pelo incentivo, amparo e amor. Obrigada por vocês estarem presentes em minha vida.

À **D. Regina**, pelos cafezinhos na hora do relaxamento, risadas, boas conversas, carinho e atenção, muito obrigada.

Aos amigos e companheiros, **Profª. Drª. Cristina Maki, Claudia Dantas Comandolli e Profª. Drª. Mayra Martins** pela amizade adquirida, incentivo e bons momentos.

Às minhas amigas queridas de Cuiabá **Cris Aguiar, Liz Busatto e Tathi Vinhal**, que sempre me incentivaram e me deram todo o carinho e amizade de que precisei nos momentos estressantes.

À **Floresta Amazônica**, por ser tão “complexa” e instigante.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“No amanhecer, todas as confusões de ontem
são coisas do passado. Hoje inicia-se um dia que nunca existiu.”

Edward Bach

RESUMO

A biodiversidade microbiana representa uma fonte importante de recursos genéticos para o avanço da biologia e biotecnologia. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar os micro-organismos isolados de frutos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) que apresentaram produção de pigmentos; analisar os pigmentos obtidos por meio da técnica de Cromatografia em Camada Delgada de Sílica Gel, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ressonância Magnética Nuclear; avaliar o potencial para consumo humano dos pigmentos obtidos realizando ensaios de citotoxicidade; caracterizar os isolados produtores quanto ao seu potencial para a produção de micotoxinas; e caracterizar os pigmentos obtidos em relação à presença de atividade antioxidante. Foram obtidos 207 fungos filamentosos de frutos de *T. grandiflorum*, destes 85 apresentaram potencial para a produção de pigmentos. Em análise morfológica e molecular, 17 foram identificados taxonomicamente como *Penicillium purpurogenum*, todos produtores de um pigmento vermelho extracelular. O pigmento obtido foi produzido pelos isolados em curto período de incubação, na ausência ou presença de luz, em temperatura ambiente e incubação meio BDA. Os ensaios de estabilidade realizados demonstraram que o pigmento possui alta estabilidade em relação a mudanças de temperatura, pH e luminosidade, inclusive em condições extremas como congelamento, liofilização e aquecimento em forno de micro-ondas. Os bioensaios realizados demonstraram que o pigmento não possui atividade antibiótica para os micro-organismos testadores (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Candida albicans*), assim como também não apresentou citotoxicidade para *Artemia salina*. Observou-se que a fração butanólica do extrato apresentou atividade antioxidante. As análises cromatográficas e espectrométricas realizadas indicam que este pigmento seja da família das antraquinonas. Faz-se necessário nova purificação do pigmento e que as análises em CLAE e RMN sejam refeitas para obter-se a determinação estrutural da molécula. Os resultados obtidos com o pigmento vermelho demonstram que este apresenta um grande potencial para sua utilização como colorante de cosméticos e alimentos, pois possui estabilidade química, solubilidade em água, atividade antioxidante, produção em um curto espaço de tempo e não possui toxicidade. Estas análises forneceram subsídios para confirmar a viabilidade de fontes naturais produtoras de pigmentos, contribuindo efetivamente com o avanço na utilização de tecnologias apropriadas para aquisição de novas fontes de compostos naturais com pouco ou sem nenhum impacto ambiental.

Palavras Chave: Fungos filamentosos, prospecção, pigmentos naturais, Cromatografia, RMN.

ABSTRACT

An important source of genetic resources is microbial biodiversity for the advancement of biology and biotechnology. The present study aimed to characterize and identify microorganisms isolated from cupuaçu fruit (*Theobroma grandiflorum*) that showed pigment production; analyze the pigments obtained by the technique of Thin Layer Chromatography in Silica Gel, High Performance Liquid Chromatography and Nuclear Magnetic Resonance; evaluate the pigment potential for human use by performing cytotoxicity assays; characterize the isolates for their potential to produce mycotoxins, and characterize the pigments obtained in relation to the presence of antioxidant activity. Were obtained 207 filamentous fungi from *T. grandiflorum* fruit, 85 of these showed potential for pigments production. On morphological and molecular analysis, 17 were taxonomically identified as *Penicillium purpurogenum*, all producers of an extracellular red pigment. The pigment was produced by the isolates in a short period of incubation in the absence or presence of light, at room temperature and on PDA. The stability assays performed showed that the pigment has high stability in relation to changes in temperature, pH and brightness, even in extreme conditions such as freezing, freeze-drying and heating in a microwave oven. Bioassays have shown that the pigment does not have antibiotic activity for testers micro-organisms (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Candida albicans*) and also showed no cytotoxicity against *Artemia salina*. It was observed that butanol fraction of the extract showed antioxidant activity. The spectroscopic and chromatographic analyzes performed indicate that this pigment belongs to anthraquinones family. It is necessary further purification of the pigment, HPLC analyzes and NMR to be redone to obtain the structural determination of the molecule. The results obtained show that the red pigment presents a great potential for use as cosmetic and food coloring. Since it has chemical stability, water solubility, antioxidant activity, production in a short time and has no toxicity. These results provided information to confirm the feasibility of natural sources for producing pigments, effectively contributing to the advancement in the use of appropriate technologies to acquire new sources of natural compounds that occurs without less or any environmental impact.

Keywords: Filamentous fungi, exploration, natural pigments, chromatography, NMR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Isolados de <i>T. grandiflorum</i> selecionados por apresentarem produção de pigmentos durante o cultivo em BDA	58
Figura 02. Isolados produtores de pigmentos em meio de cultivo BD. A: CIAM 045, <i>P. purpurogenum</i> , e B: AIAM 006, <i>Fusarium sp.</i>	59
Figura 03. Cultivo de CIAM045 em meio Caldo Batata Dextrosado e Caldo Batata Dextrosado acrescido de Peptona (2%), mostrando a não produção do pigmento vermelho na presença de peptona.....	61
Figura 04. Cultivos líquidos de CIAM045 em diferentes fontes de carbono.	62
Figura 05. Partição Líquido-Líquido do extrato bruto de CIAM 045 mostrando a fase BuOH superior e a fase aquosa inferior.....	64
Figura 06. Cromatoplaca das frações DCM e AcOEt da PLL dos extratos de CIEAM2001, CIAM045, AIAM006 e CIAM042, com sistema de eluição DCM/AcOEt.	65
Figura 07. Cromatoplaca das frações butanólicas da PLL dos extratos de CIAM045, AIAM006 e CIAM 042 com sistema de eluição MeOH.....	66
Figura 08. Cromatoplaca das frações butanólicas da PLL dos extratos de CIAM045, AIAM006 e CIAM 042 com sistema de eluição, AcOEt/MeOH.....	67
Figura 09. Cromatoplaca dos extratos obtidos de exudado da colônia fúngica dos isolados CIAM045 e CIAM042, com sistema de eluição AcOEt.	69
Figura 10. Cromatoplaca das frações butanólicas da PLL dos extratos de	70

CIAM045, CIAM 042 e CIEAM 2001 e do Meio BD, com sistema de eluição AcOEt/MeOH.....	
Figura 11. Cromatoplaça das frações butanólicas da PLL dos extratos de CIAM045, CIAM 042 e AIAM 006, com sistema de eluição BAW.....	70
Figura 12. Cromatoplaça das frações butanólicas da PLL dos extratos de CIAM045, CIAM 042 e AIAM 006, com sistema de eluição BEW.....	71
Figura 13. Espectro da purificação em CLAE da fração butanólica obtida na PLL do extrato do isolado CIAM045.....	74
Figura 14. Espectro de análise em CLAE do extrato puro exudado do cultivo do isolado CIAM045.....	74
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de gfz.2 , DMSO- <i>d</i> ₆	76
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de gfz.4 , DMSO- <i>d</i> ₆	79
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de gfz.4 , DMSO- <i>d</i> ₆	80
Figura 18. Mapa de Contorno de HMQC (500/125 MHz) de gfz 5 , DMSO- <i>d</i> ₆	81
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de gfz.5 , DMSO- <i>d</i> ₆	82
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de gfz.5 , DMSO- <i>d</i> ₆	82
Figura 21 Mapa de Contorno de HMQC (500/125 MHz) de gfz 5 , DMSO- <i>d</i> ₆	83
Figura 22. Béquer contendo larvas de <i>Artemia salina</i> com 48 h.....	87
Figura 23. Resultado da PCR para a amplificação do gene <i>otanpksPN</i> do poliquetídeo de ocratoxina A.....	90
Figura 24. Resultado da PCR para a amplificação do gene <i>otanpsPN</i> do peptídeo de ocratoxina A.....	90
Figura 25. Resultado da PCR para a amplificação do gene <i>idh</i> , enzima	92

desidrogenase isoepoxydon.....	
Figura 26. Resultado da PCR para a amplificação do gene <i>aflR</i> , gene regulador de aflatoxina.....	94
Figura 27. Resultado da PCR para a amplificação do gene <i>stcE</i> , gene de esterigmatocistina.....	94
Figura 28. Resultado da PCR para a amplificação do gene <i>nor1</i> , gene para o ácido norsolorínico, mostrando resultado positivo para o isolado AIAM023.....	95
Figura 29. Resultado da PCR para a amplificação do gene <i>ver1</i> , gene para versicolorina.....	95
Figura 30. Resultado da PCR para a amplificação do gene <i>omtA</i> , gene para O-metilesterigmatocistina.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Lista de <i>primers</i> que serão utilizados para a identificação molecular de produtores de micotoxinas.....	49
Tabela 02. Resultado do Isolamento de frutos de <i>T. grandiflorum</i>	55
Tabela 03. Resultado da identificação taxonômica por método clássico de caracterização morfológica.....	56
Tabela 04. Listagem de isolados já identificados por taxonomia molecular.	57
Tabela 05. Amostras submetidas a análise em CLAE e condições da corrida.....	73
Tabela 06. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H , da fração gfz.2	77
Tabela 07. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , da fração gfz.4	79
Tabela 08. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das fração gfz.5	84
Tabela 09. Resultado dos ensaios de atividade antioxidante com radical DPPH dos extratos obtidos do cultivo do isolado CIAM 045.....	86
Tabela 10. Ensaio de citotoxicidade da fração butanólica do extrato pigmentado de CIAM045	87

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 01. CIAM 045 - Seqüência de região ITS, contraste com o GenBank com o programa Blast.....	105
Apêndice 02. AIAM 006 - Seqüência de região ITS, contraste com o GenBank com o programa Blast.	108
Apêndice 03 Listagem de DNA de isolados enviados para sequenciamento	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila
AcOEt – Acetato de etila
BD – Caldo Batata Dextrosado
BDA – Batata Dextrose Ágar
BuOH – Butanol
CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CG – Cromatografia em Fase Gasosa
CL₅₀ – Concentração Letal de 50% dos indivíduos
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCM – Diclorometano
DMSO- d₆ - Dimetilsulfóxido deuterado
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EDTA - Ácido Etilenodinitrilotetracético sal dissódico
EROS – Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH – Etanol
H₂O – Água
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
MeOH – Metanol
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
PLL- Partição Líquido – Líquido
rDNA – Ácido desoxirribonucléico ribossomal
R_f – Fator de retenção
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
TRIS-HCl – Tampão Trizma base
UFAM – Universidade Federal do Amazonas
UV – Luz ultra-violeta

SUMÁRIO

BANCA EXAMINADORA.....	iii
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE APÊNDICES	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
SUMÁRIO.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Micro-organismos Endofíticos.....	4
2.2. Metabólitos Produzidos por Micro-organismos.....	6
2.3. Pigmentos Naturais Produzidos por Micro-organismos.....	9
2.4. Micotoxinas.....	16
2.5. Atividade Antioxidante.....	20
2.6. Atividade Toxicológica	24
2.7. CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	25
2.7. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	27
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo Geral.....	30
3.2. Objetivos Específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Coleta, Isolamento, Identificação e Conservação	32
4.1.1. Isolamento de fungos filamentosos	33
4.1.2. Conservação dos isolados	34
4.1.3. Seleção dos isolados produtores de pigmentos	35

4.1.4. Identificação taxonômica clássica dos isolados	35
4.1.5. Identificação taxonômica molecular dos isolados	35
4.2. Análises Bioquímicas	38
4.2.1. Ensaios de condições de cultivo	38
4.2.2. Obtenção dos pigmentos	39
4.2.3. Ensaios de estabilidade dos extratos pigmentados	39
4.2.4. Partição líquido - líquido	40
4.2.5. Análise cromatográfica em camada delgada dos extratos	42
4.2.6. Análises e purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	43
4.2.7. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	44
4.3. Ensaios Biológicos	44
4.3.1 Ensaio antioxidante - metodologia empregando o DPPH	44
4.3.2. Ensaio de toxicidade utilizando <i>Artemia salina</i>	46
4.3.3. Ensaios de atividade antimicrobiana	47
4.3.4. Metodologia molecular de caracterização de produção de micotoxinas	48
4.4. Meios de Cultivo e Soluções.....	50
4.4.1. Àgar Batata Dextrose.....	50
4.4.2. Àgar Sabouraud.....	51
4.4.3. Solução NaCl 0,85% (p/v)	51
4.4.4. Ácido Etilenodinitrilotetracético sal dissódico (EDTA) 0,5M pH 8,0	51
4.4.5. Tampão Tris-HCl pH 8,0 1M.....	52
4.4.6. Clorofane.....	52
4.4.7. Clorofil.....	52
4.4.8. Tampão de extração.....	52

4.4.9. Tampão de corrida TEB 10X	53
4.4.10. Tampão da amostra.....	53
4.4.11. Gel de agarose (0,7% e 1,4%)	53
4.5. Esterilização	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1. Coleta, Isolamento e Identificação dos Isolados Fúngicos	55
5.1.1. Identificação taxonômica dos isolados	55
5.1.2 Seleção dos isolados produtores de pigmentos	56
5.2 Análises Bioquímicas	58
5.2.1 Obtenção do pigmento	59
5.2.2. Ensaio de condições de cultivo	59
5.2.3 Ensaio de estabilidade	62
5.2.4 Partição líquido-líquido	63
5.2.5. Análise cromatográfica em camada delgada dos extratos	64
5.2.6. Análises e purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	73
5.2.7. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	76
5.3 Ensaio Biológicos	85
5.3.1 Ensaio antioxidante - metodologia empregando o DPPH	85
5.3.2 Ensaio de atividade antimicrobiana	87
5.3.3. Ensaio de toxicidade utilizando <i>Artemia salina</i>	87
5.4. Ensaio Moleculares.....	90
6. CONCLUSÕES	97
7. REFERÊNCIAS.....	99
8. APÊNDICES	108

1. INTRODUÇÃO

Tratando-se de micro-organismos, sabe-se que são fontes capazes de produzir substâncias químicas resultantes do metabolismo primário e secundário, envolvendo vias metabólicas responsáveis pela síntese de produtos naturais (MELO, 2002). Potencialmente, possuem importância biotecnológica como produtores de novos compostos farmacêuticos, compostos aromáticos e pigmentos entre outras características, que podem ser encontradas por meio de uma maior exploração dos mesmos (AZEVEDO *et al.*, 2000). Estes micro-organismos apresentam diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas e na produção de produtos biotecnológicos.

A maioria dos pigmentos naturais usados hoje para colorir alimentos vem da família das *Magnoliophyta* (plantas frutíferas). No entanto, pigmentos naturais também são obtidos de outras fontes como insetos (cochinilha e lac), fungos (*Blakeslea trispora* e *Monascus* spp.) e cianobactérias (*Arthrospira* spp.) (MORTENSEN, 2006). O grande entrave em relação a produção/obtenção de pigmentos a partir de plantas e insetos é o custo de produção, além da dependência de condições climáticas favoráveis. O que torna os micro-organismos fonte mais rentável, segura e limpa de produção, uma vez que através de técnicas de fermentação em bioreatores (já bem estabelecidas e utilizadas em larga escala) pode-se obter uma produção controlada e com garantia de alta produtividade em qualquer época do ano.

A detecção de metabólitos bioativos é o ponto inicial para uma estratégia de abordagem na pesquisa por substâncias com potencial para o uso em fármacos, cosméticos, aditivos alimentícios e etc. Segundo Larsen e Hansen (2008), fungos filamentosos, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* produzem alguns dos mais bem conhecidos e economicamente importantes produtos naturais de origem fúngica, incluindo substâncias farmacêuticas famosas como a penicilina, o redutor de colesterol mevinolin, produzido por várias espécies de *Aspergillus*, e o antifúngico e anticancerígeno griseofulvina.

Pigmentos naturais podem ser obtidos de plantas ou micro-organismos, estes últimos sendo de grande interesse devido à estabilidade do pigmento produzido, baixo custo de produção e produtividade alta. Segundo Mortensen (2006), os pigmentos alimentares podem ser divididos em quatro categorias: (1) pigmentos naturais, (2) pigmentos idênticos aos naturais, (3) pigmentos sintéticos e, (4) pigmentos inorgânicos.

Por muitos anos, a maioria dos químicos naturalistas estava mais preocupada em isolar e elucidar a estrutura de moléculas provenientes do metabolismo secundário do que em seu potencial como bioativos. Modernos avanços nas técnicas de separação e espectroscopia forneceram ferramentas para a purificação e análise estrutural que alcançaram níveis extraordinários de sensibilidade e sofisticação. De posse dessas ferramentas, químicos de produtos naturais se aventuraram em ensaios biológicos para o isolamento de metabólitos, e estão agora guiando sua atenção para a bioatividade destas substâncias naturais (GHISALBERTI, 2008).

Na maioria dos países, o uso de aditivos alimentares (incluindo pigmentos) é regulada por uma legislação bem restrita. Essa legislação especifica quais pigmentos podem ser usados, a fonte desses pigmentos, a pureza da substância, em quais alimentos podem ser adicionados e a concentração e quantidade desse pigmento que pode ser adicionada em cada alimento. Isso se deve ao cuidado dos órgãos reguladores em evitar intoxicações em massa ou a utilização de produtos que poderiam trazer algum tipo de problema a saúde humana, como por exemplo, a presença de micotoxina em cereais, grãos e rações. Métodos rápidos e eficientes de detecção da presença de linhagens produtoras de micotoxinas são importantes para a produção de controle de alimentos que sejam toxicologicamente seguros para consumo humano e animal. Segundo Geisen (1996) uma das técnicas utilizadas comumente utilizadas para a detecção da presença de micro-organismos patogênicos e toxigênicos em vários substratos, inclusive alimentos é da PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.

Tendo em vista a grande importância econômica e a demanda de consumo dos pigmentos naturais, pelas indústrias, pretende-se buscar micro-organismos isolados de frutos de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), que gerem compostos com potencial biotecnológico. Em complementação a essa pesquisa, ampliar as perspectivas para novos estudos sobre a Biodiversidade de Micro-organismos isolados por técnicas de cultivo tradicionais de plantas frutíferas da Região Amazônica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micro-organismos Endofíticos

Evolutivamente as plantas vêm desenvolvendo complexos mecanismos adaptativos, muitos destes, somente possíveis graças às interações com os micro-organismos. Destes micro-organismos destacam-se os endofíticos que, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, habitam o interior de tecidos vegetais, sem causar dano aparente aos mesmos (PEIXOTO NETO *et al.*, 2004). Esta classificação possui um cunho puramente didático, onde, de acordo com Azevedo *et al.* (2000), há um gradiente com interfaces entre endófito, patógeno e epifítico.

As interações entre planta e endofíticos ainda não são bem compreendidas, mas podem ser: simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas o micro-organismo produz ou induz a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta, tais como: diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros micro-organismos. (RODRIGUES & DIAS-FILHO, 1996). Por exemplo, a planta fornece carbono para o desenvolvimento do fungo que em contrapartida, pode proteger a planta contra o ataque de mamíferos ou insetos herbívoros, produzindo alcalóides e/ou outros componentes tóxicos (COSTA PINTO *et al.*, 2000).

O primeiro relato de isolamento de fungos endofíticos em plantas tropicais foi feito por Dreyfuss & Petrini (1984) em Araceae, Bromeliaceae e Orchidaceae da Guiana Francesa, Brasil e Colômbia. Depois disso, alguns grupos de plantas

foram investigados para a presença de endofíticos, principalmente palmeiras e árvores frutíferas (AZEVEDO *et al.*, 2000). Sieber *et al.* (1988) relataram que a presença de fungos endofíticos é um fenômeno geral e comum aos vegetais, pelo fato de que, em todas as plantas já investigadas foram encontrados tais micro-organismos.

Endofíticos examinados a partir de uma gama enorme de fontes demonstraram que uma grande quantidade destes produzem produtos naturais com potencial para muitas aplicações. Essa afirmação se faz especialmente correta, quando esses endofíticos provem de plantas superiores existentes em florestas tropicais, uma vez que existe uma enorme variedade microbiológica nessas regiões (STROBEL & CASTILLO, 2008).

Com o avanço de tecnologias, o conhecimento das potencialidades e uso dos fungos endofíticos vem aumentando a motivação em pesquisas, evidenciando muitas aplicações biotecnológicas. Os micro-organismos associados às espécies de plantas, as quais são fontes riquíssimas de produtos metabólicos (anticancerígenos, antimicrobianos, antiviróticos, agentes anticancerígenos) podem, em determinado momento, dispor da matéria prima com potencial tão elevado quanto aqueles disponíveis pelos seus hospedeiros, sugerindo a importância da planta hospedeira, influenciando o metabolismo dos endófitos (STROBEL & DAISY, 2003).

A consolidação de estudos com espécies tropicais tem-se intensificado na Amazônia por meio de pesquisas desenvolvidas em palmeiras (RODRIGUES, 1994), *Theobroma grandiflorum* (MEDEIROS-GALVÃO, 1998), *Copaifera multijuga* (CASSA-BARBOSA, 2001), *Bactris gasipaes* (COSTA NETO, 2002),

Manihot esculenta Crantz (RONDON, 2003) e *Paullinoba longiflora* e *Strychnos cogens* (SOUZA, *et al.*, 2004), todas desenvolvidas na Universidade Federal do Amazonas.

O aumento dos estudos com plantas tropicais, possibilitará uma melhor compreensão dos mecanismos simbióticos desenvolvidos, e um melhor aproveitamento do seu potencial biotecnológico, principalmente com relação ao metabolismo secundário. Tendo em vista a grande biodiversidade vegetal de clima tropical em países da América Latina, estima-se que cada espécie vegetal possua micro-organismos endofíticos ainda não classificados. E portanto apresentando diversidades genéticas capazes de prover compostos estruturalmente diversificados com atividades biológicas pouco conhecidas, gerando um potencial de aplicação para a produção em escala de compostos de alto valor agregado, além de possibilitar o avanço de estudos, no que se refere às interações desses metabólitos com o ecossistema (PEIXOTO NETO *et al.*, 2004).

2.2. Metabólitos Produzidos por Micro-organismos

Sabe-se que os micro-organismos são fontes capazes de produzir substâncias químicas resultantes do metabolismo primário e secundário, envolvendo vias metabólicas responsáveis pela síntese de produtos naturais, sendo derivados dos precursores, gerados através da energia do metabolismo primário (MELO, 2002). A produção destes metabólitos pode ser aumentada a partir da otimização dos componentes que participam dos meios de crescimento, das condições em que se realiza a fermentação e da otimização do processo de

downstream, etapas estas, fundamentais para o processo de recuperação do produto final, de melhor qualidade e em maior concentração (PADILLA, 2002).

Metabolismo secundário está comumente associado com processos de esporulação e produção de metabólitos. Metabólitos secundários podem ser organizados em três diferentes categorias: (i) metabólitos que controlam a esporulação, (ii) pigmentos necessários para as estruturas de esporulação, e (iii) metabólitos tóxicos secretados pelas colônias em crescimento mais ou menos no mesmo momento em que ocorre a esporulação (micotoxinas) (SANZANI, *et al.*, 2012).

Baseando-se em todos os avanços de técnicas biotecnológicas, por meio do conhecimento da fisiologia de crescimento do micro-organismo, do desenvolvimento de novos equipamentos e dos avanços da biologia molecular e engenharia genética, tem-se conseguido incrementos substanciais na produção e caracterização de compostos de aromas, óleos, fármacos etc, a partir do cultivo de micro-organismos. Entre os micro-organismos isolados e estudados para a bioprospecção de compostos bioativos, destacam os endofíticos. O grande interesse nos micro-organismos endofíticos está associado ao seu potencial biotecnológico.

Fungos filamentosos possuem propriedades que podem desempenhar um papel importante no estilo de vida dos humanos e no ambiente, participando da produção de alimentos, produtos de saúde e reciclando compostos orgânicos na biosfera. O potencial bioquímico e a adaptação a condições extremas de vida são fatores importantes no ciclo de vida dos micro-organismos e têm sido explorados

na produção de moléculas como antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos e pigmentos (HAJJAJ *et al.*, 2000).

Endofíticos isolados, como *Xylaria* sp possuem fatores de crescimento como a giberelina ou ainda, substâncias antitumorais como o taxol, encontradas em *Taxomyces andreanae* (STROBEL & DAISY, 2003). Vários outros estudos podem ser citados como aqueles desenvolvidos com a planta aquática *Rhyncholacis penicillata*, onde o estudo de endofíticos desta espécie, revelou a existência da bactéria *Serratia marcescens* que possuía como metabólito bioativo um potente antifúngico (STROBEL *et al.*, 1999). Ainda dentro dos trabalhos realizados com micro-organismos isolados da Floresta Tropical, temos o fungo endofítico *Colletotrichum dematium*, isolado da planta *Pteromischum* sp., que apresenta um peptídeo imunossupressor, a Colutellin A com grande potencial farmacológico (REN *et al.*, 2008). Outros metabólitos produzidos pelos endofíticos são as toxinas, identificadas a partir de tecidos fúngicos, tais como os alcalóides, N-formil e N-acetil lolina, eramina, lolitrem B, ergovalina, dentre outras. A produção destes metabólitos pode ser influenciada por fatores bióticos e/ou abióticos, estando relacionados com a situação fisiológica do próprio hospedeiro (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Recentemente, endofíticos do gênero *Colletotrichum* foram isolados de *Artemisia annua*, erva medicinal de onde se extrai a droga antimalárica artemisinina, sendo detectada a síntese de pelo menos 11 compostos produzidos pelo endófito onde a maioria exibiu atividade *in vitro* antifúngica e bactericida (LU *et al.*, 2000). Strobel & Daisy (2003) citam *Pestalotiopsis microspora* como um endofítico tipicamente tropical, mostrando grande diversidade bioquímica,

consequentemente maior produção de metabólitos secundários pelas mais diversas linhagens deste micro-organismo. Um endófito desta espécie foi isolado de *Torreya taxifolia*, produzindo várias combinações de metabólitos com atividade antifúngica, incluindo pestalosideo, um aromático β -glucosídeo, e duas pironas: pestalopirona e hidroxipestalopirona. Estes produtos também apresentam propriedades fitotóxicas.

2.3. Pigmentos Naturais Produzidos por Micro-organismos

A utilização de pigmentos naturais em alimentos tem aumentado nos últimos anos em razão das vantagens de *marketing* em utilizar ingredientes naturais e em razão da preocupação do consumidor sobre eventuais efeitos prejudiciais que os pigmentos sintéticos possam causar. Como por exemplo o Fast Green, pigmento amplamente utilizado como colorante em alimentos, foi demonstrado como sendo um agente imunotóxico (ALI & BASHIER, 2006).

A atual preferência do consumidor por corantes de origem natural está associada com a imagem de que estes são saudáveis e de boa qualidade. Pigmentos naturais tem aumentado sua popularidade por que os pigmentos sintéticos tendem a ser vistos como indesejáveis ou prejudiciais à saúde; alguns sendo considerados como responsáveis por alergias e reações de intolerância (WISSGOTT & BORTLIK, 1996). A cor possui um importante papel no alimento que consumimos. Por exemplo, quando confrontado com uma cor não atraente, o consumidor assume que o alimento é pobre ou estragado. Em contrapartida,

alimentos com cores atípicas – por exemplo, queijo verde ou bebidas azuis – na maioria das vezes são rejeitadas pelo consumidor (DUFOSSÉ, 2006).

Ao final do século XIX, o desenvolvimento da indústria de alimentos levou à produção de inúmeros corantes sintéticos, os quais chegaram a totalizar o número de 700. Prevaleram razões de ordem estética em detrimento da qualidade do produto. Seguiu-se então a formulação de leis para uso destes corantes, com o objetivo de proteger a saúde do consumidor. Assim, no início do século XX, uma lista dos corantes permitidos foi divulgada nos EUA e hoje, apenas sete corantes sintéticos são permitidos (MORITZ, 2005).

Não existem estatísticas confiáveis sobre o tamanho do mercado de pigmentos, entretanto, em uma escala global, estima-se que gire em torno de 940 milhões de dólares por ano, dos quais 250 milhões de dólares são voltados para a produção de pigmentos naturais (DOWNHAM & COLLINS, 2000). As vendas totais de corantes e pigmentos da indústria química brasileira foram de US\$ 274 milhões, em 1995, tendo decrescido em relação a 1990, quando atingiu US\$ 391 milhões. Das indústrias brasileiras de corantes, cerca de 60% são produtoras de corantes naturais e 10% de sintéticos. Dentre os corantes naturais, o urucum é o mais produzido. Essas empresas, na sua grande maioria, não são exportadoras (MAIMOM, 2000).

Quase todos os pigmentos naturais presentes nos alimentos possuem estruturas complexas com diferentes grupos funcionais nas moléculas. Os principais tipos de pigmentos naturais estão agrupados pelo tipo de estrutura básica em: porfirinas, betalaínas, flavonóides, antocianinas (cores azul e vermelho), antoxantinas, (cores nos tons amarelos), leucoantocianidinas

(incolores), carotenóides, taninos e outros pigmentos (quinonas – ácido carmínico, polifenóis, Monascus - Monascin, etc.) (BOBBIO e BOBBIO, 1995). Como plantas, fungos filamentosos sintetizam produtos naturais por possuírem uma função ecológica e são de algum valor para o produtor. Dependendo do tipo de substância, ela possui diferentes funções- variando entre uma função de proteção contra foto-oxidação a proteção contra estresse ambiental, ou agindo como um co-fator na catalise de enzimas (MAPARI, *et al.*, 2005).

Pesquisadores na área de desenvolvimento de produtos alimentícios freqüentemente buscam novas fontes alternativas de materiais para corar alimentos (WISSGOTT & BORTLINK, 1996). Ao contrário das plantas, fungos são adequados para a produção biotecnológica de pigmentos devido ao fato de crescerem usando técnicas de cultura conhecidas (DURAN, *et al.*, 2004). Considerando a estabilidade de derivados do gênero *Monascus* durante o processamento de alimentos e da extraordinária diversidade de pigmentos fúngicos, os fungos prometem ser a fonte mais provável de novos pigmentos (WISSGOTT & BORTLINK, 1996). Pigmentos de origem microbiana possuem a vantagem de serem produzidos em condições que independem do clima, não requerem uma grande área para seu crescimento e podem ser produzidos em qualquer quantidade e em um curto período de tempo (FRANCIS, 1987).

Uma rota alternativa para a produção de colorantes naturais para alimentos é a utilização de aplicação de ferramentas biotecnológicas de micro-organismos (MAPARI, *et al.*, 2005). Pigmentos naturais, produzidos por micro-organismos, vem ganhando atenção pela indústria de alimentos na Europa e Estados Unidos devido a estabilidade do pigmento produzido, a possibilidade de produção

industrial e a viabilidade da tecnologia de cultivo que pode ser otimizado para grandes quantidades (MAPARI, *et al.*, 2006).

Algas unicelulares e fungos são melhores opções para novos pigmentos derivados de biotecnologia. Um recente desenvolvimento foi o do β -caroteno produzido pelo fungo *Blakeslea trispora*. Carotenos são produzidos por fermentação em reatores. Este tem sido atualmente comercializado como um colorante natural de alimentos por Gist Brocades (DSM Gist Brocades Delf, Heerlen, The Netherlands) (DOWNHAM & COLLINS, 2000).

Pigmentos característicos são produzidos por uma grande variedade de fungos. Espécies de *Drechslera* produzem hidroxiantraquinonas (pigmentos marrom, vermelho, bronze), ou o composto similar, eritroglaucina (vermelho), que é produzido por *Aspergillus glaucus* produtor também de auroglaucina (laranja) e flavoglaucina (amarelo). Muitas micotoxinas são pigmentadas, p. ex., naftoquinonas de *Penicillium* e *Aspergillus* (Duran, *et al.*, 2004). Pigmentos vermelhos de *Monascus* e/ou pigmentos amarelos são eficientemente produzidos por várias linhagens comercialmente importantes (SHIN, 1998).

Os mais importantes pigmentos, as antraquinonas, foram por muito tempo, de crucial importância na indústria de corantes (HOBSON & WALES, 1998). Esses metabólitos seguramente são secundários e não possuem função clara no crescimento celular. Eles são sintetizados por um período finito por células que não são mais de crescimento vegetativo. Ao contrário, o metabolismo primário inclui todos os processos anabólicos e catabólicos que estão finamente equilibrados para manter o organismo vivo. Existe uma série de metabólitos secundários que são usados pela Biotecnologia moderna e foram principalmente

obtidos de plantas, p. ex., índigo, ácido carmínico, conina, etc, que foram aplicados em corantes, perfumes, condimentos, compostos tóxicos, agentes farmacológicos e cosméticos (DURAN, *et al.*, 2004).

Naftoquinonas são amplamente distribuídas na natureza e têm sido encontradas também em fungos (PARISOT *et al.*, 1990) e em actinomicetos (TANAKA, *et al.* 1975). Em fungos, os pigmentos naftoquinômicos são muito comuns e têm sido alvo de numerosos estudos. Os pigmentos naftoquinômicos relacionados à fusarubina obtida do fungo *Fusarium solani* (Mart) (PARISOT *et al.*, 1990) têm sido descritos em detalhes. Pigmentos de isolados do gênero *Monascus* solúveis em água são de grande interesse biotecnológico (MARGALITH, 1992). Recentemente Jiang *et al.* (2005) isolaram um *Penicillium* *sp* endofítico produtor de um pigmento vermelho solúvel em água e termoestável com estrutura semelhante ao policetídeo vermelho produzido por isolados do gênero *Monascus*.

Não só micro-organismos endofíticos foram identificados como produtores de pigmentos. O fitopatógeno, *Fusarium verticillioies* isolado do solo apresentou produção de naftoquinômicos e estudos comparativos para otimização da produção em meio líquido mostraram uma produtividade excelente (BOONYAPRANAI, *et al.*, 2008). O fungo entomopatogênico *Cordyceps unilateralis* foi identificado como produtor de seis pigmentos extracelulares naftoquinômicos (UNAGUL, *et al.*, 2005).

Recentemente Mapari, *et al.* (2009) realizaram estudos com espécies de ascomicetos produtores de pigmentos, avaliando seu potencial para a produção de pigmentos associado ou não com a produção de micotoxinas. Estes estudos

mostraram que os isolados de *Penicillium purpurogenum* testados produziram um pigmento similar a N-glutarylmonascorubramine, o pigmento vermelho termoestável produzido por *Monascus*, mas sem a produção de micotoxinas. *Monascus* pode produzir pigmentos amarelos, alaranjados e vermelhos, mas estes não são hidrosolúveis, são instáveis em pH extremo (2 e 14), em calor e exposição à luz. Outra desvantagem é que o gênero é conhecido por produzir micotoxinas como citrinina (HAJJAJ, *et al.*, 2000).

Ascolor s.r.o. (República Checa) possui várias patentes relacionadas a uma linhagem fúngica de *P. oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242 produtora de um pigmento vermelho que pode ser aplicado na indústria alimentícia e cosmética. Linhagem que foi obtida do solo e produz um cromóforo da família das antraquiinonas. Arpink Red foi aprovado para uso pela Comissão do Codex Alimentarius (2002) para uso em carnes e produtos análogos de carnes, bebidas não alcoólicas, sorvetes e derivados de leite (DUFOSSE, *et al.*, 2005).

A indústria de corantes vem sofrendo com o aumento dos custos das matérias-primas e da energia para a síntese, bem como com a pressão para minimizar os danos ao ambiente causados pelo processo de produção, o qual gera efluentes. Logo, as indústrias estão buscando vias mais econômicas e amigáveis ao ambiente para os corantes existentes. Por meio de técnicas biotecnológicas, antraquinonas tem sido isoladas de inúmeros fungos, p. ex., *Trichoderma*, *Drechslera*, *Aspergillus*, *Curvularia* (HOBSON *et al.*, 1997; GILL, 2003). Uma grande variedade de vegetais, plantas, animais e micro-organismos produzem pigmentos. Sua forma de produção é variada e a tecnologia utilizada para sua produção, depende principalmente, do agente empregado neste

processo (MORITZ, 2005). Explorando a síntese fúngica de antraquinonas, observam-se várias vantagens em comparação com os métodos químicos utilizados atualmente que requerem altas temperaturas, altos custos energéticos e a utilização de ácidos e alcalis, pouco amigáveis da síntese orgânica, não são necessários (DURAN, *et al.*, 2004).

Apesar do enorme potencial econômico do pigmento de *Monascus*, este não é levado para exploração comercial no mundo ocidental, devido a ignorância e também a relutância a mudanças pelas agências públicas de alimentos. Na verdade essas agências não aprovam o uso de pigmentos de *Monascus* para seu uso na indústria de alimentos apesar de aparentarem não serem tóxicos com seu uso frequente. Apesar de que espécies de *Monascus* tem sido consumidas no Oriente por muitos anos, isso não ajuda o pigmento a ganhar aprovação pelas União e Europeia e Estados Unidos (DUFOSSÉ, *et al.*, 2005).

Enquanto os pigmentos sintéticos estão sendo reduzidos, o mercado de pigmentos naturais está em expansão. Neste contexto, os métodos mais adequados de produção e extração destes pigmentos merecem ser estudados. A base científica brasileira deve ser incrementada para a industrialização e introdução destes produtos de origem biotecnológica principalmente no mercado nacional. Porém, mesmo nos países da União Europeia, a fermentação submersa para a produção de pigmentos, ainda é um campo a ser explorado (MORITZ, 2005). Além de promover diversidade funcional ao hospedeiro, esses pigmentos exibem uma estrutura única e diversidade química com uma extraordinária gama de cores. Como esses pigmentos são solúveis em água eles não requerem

modificações químicas ou o uso de carreadores e estabilizantes para dispersão em alimentos (MAPARI, *et al.*, 2005).

Os corantes vermelhos produzidos por culturas em meios sólidos (arroz, por exemplo) são os mais estudados na Ásia, por diversas espécies do gênero *Monascus*; utilizados principalmente para colorir alimentos fermentados (PASTRANA, *et al.*, 1995). Tal fato demonstra que os países em desenvolvimento também podem investir neste campo de conhecimento, buscando competir neste mercado, principalmente o Brasil devido a sua imensa biodiversidade. Suas propriedades terapêuticas e sua relativa estabilidade com respeito ao pH e temperatura são aspectos importantes para que possam substituir os corantes sintéticos (MORITZ, 2005).

2.4. Micotoxinas

Fungos produzem uma grande gama de substâncias, com uma enorme variedade de estruturas químicas e atividade biológica. Certos metabólitos fúngicos são altamente desejáveis em alguns alimentos como queijos, enquanto outros são importantes antibióticos, como penicilina, por exemplo. Entretanto, alguns fungos podem produzir substâncias que são potentes toxinas ou carcinogênicos tanto para animais como para seres humanos. Esses agentes tóxicos são comumente chamados de micotoxinas, um termo reservado para descrever toxinas produzidas por fungos filamentosos (SHIBAMATO & BJELDANES, 1993). A contaminação de alimentos e produtos alimentares por micotoxinas é um problema mundial. Alguns fungos são capazes de produzir mais

de uma micotoxinas, e algumas micotoxinas são produzidas por mais de uma espécie fúngica (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

Segundo Shibamoto & Bjeldanes (1993), o impacto desses fungos em doenças humanas também tem sido reconhecido por séculos, mas o seu papel como possíveis carcinogênicos tem sido tema de pesquisas apenas a partir da década de 1960. Centenas de micotoxinas foram identificadas e são produzidas por mais de 200 espécies, dentro dos gêneros de fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. São fungos que são encontrados no ambiente e fazem parte da flora microbiana de plantas (FORSYTHE, 2002). As micotoxinas são metabólitos secundários poliquetideos, cuja estrutura carbônica é proveniente do acetato e do malonato (JAY, 2005).

A toxicidade das micotoxinas está classificada em quatro classes: aguda, resultando em danos aos rins e fígado; crônica, resultando em câncer de fígado; mutagênica, causando danos ao DNA; e teratogênica, causando má-formação congênita (FORSYTHE, 2002).

No que tange à indústria de alimentos os novos corantes devem ser submetidos a ensaios toxicológicos para garantir a segurança do seu uso (MASCARENHAS, 1999). Para que um aditivo alimentar ou coadjuvante de tecnologia seja aprovado no Brasil são consideradas referências internacionalmente reconhecidas, como o Codex Alimentarius, a União Européia e, de forma complementar, a U.S. Food and Drug Administration – FDA. Esse critério é estabelecido pela legislação brasileira – Portaria SVS/MS n. 540/1997 – e pelo MERCOSUL – GMC/RES. N° 52/98.

Como o objetivo deste trabalho é buscar pigmentos que possam ser utilizados na indústria alimentícia e cosmética, faz-se necessária a identificação de linhagens produtoras dessas substâncias tóxicas. Pois linhagens que produzam pigmentos, mas que também produzam micotoxinas, não podem ser utilizadas para consumo humano, inviabilizando sua utilização. Uma das metodologias utilizadas para avaliar se um micro-organismo produz ou possui o potencial para a produção de determinadas micotoxinas é por identificação do gene por técnicas moleculares. Essa metodologia emprega o uso de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a identificação dos genes produtores ou de genes que façam parte da via biosintética de cada micotoxina.

Segundo Paterson e colaboradores (2006), ocratoxina A é talvez a mais importante toxina produzida pelo taxon *Penicillium*. Patulin é a segunda mais importante micotoxina do gênero e possui legislação bem restrita em relação a sua presença principalmente em alimentos para bebês a base de frutas pela União Europeia (2004).

As ocratoxinas consistem em um grupo de pelo menos sete metabólitos secundários relacionados estruturalmente, do quais a ocratoxina A é a mais conhecida e tóxica. É produzida por um grande número de fungos, incluindo *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus mellus*, entre outras espécies de *Aspergillus*. Entre os fungos do gênero *Penicillium* que produzem a ocratoxina, estão *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium* e *Penicillium variable* (JAY, 2005). Ocratoxina A é uma micotoxina com efeito nefrotóxico que também possui propriedades hepatotóxica, imunogênica e teratogênica (HOHLER, 1998). Também é classificada como um carcinogênico de classe II

pela Organização Mundial da Saúde (PTZINGER & ZIEGLER, 2000). É predominantemente nefrotóxica e está relacionada a epidemiologia da nefropatologia em suínos e possivelmente na nefropatologia endêmica em humanos em Balkan, também sendo evidente seu efeito carcinogênico (MOSS, 2002).

A patulina foi isolada pela primeira vez por Birkinshaw e colaboradores em 1943 de *Penicillium griseofulvum* e *Penicillium expansum*. Esse trabalho fez parte do esforço em buscar por novas moléculas com propriedades antibióticas produzidas por fungos, em meio ao entusiasmo que a descoberta da penicilina por Fleming causou (PUEL, *et al.*, 2010). Mas estudos posteriores demonstraram que a patulina possuía efeitos tóxicos não só contra fungos e bactérias, mas também em animais. Apesar de que a patulina é produzida por diferentes gêneros de fungos e espécies (MOAKE, *et al.*, 2005), é na maioria das vezes associada a *P. expansum*, o agente causal do mofo azul de frutos do tipo pomo, principalmente maçãs (SANZANI, *et al.*, 2012). É a toxina mais comumente encontrada em maçãs, produtos derivados de maçã como sucos, cidra, compotas e alimentos direcionados a alimentação infantil. A exposição a essa micotoxina está associada a problemas imunológicos, neurológicos e gastro-intestinais. O conhecimento dos riscos a saúde humana devido a exposição a patulina levaram muitos países a organizar medidas reguladoras de qualidade dos alimentos (PUEL, *et al.*, 2010).

As aflatoxinas são as micotoxinas mais amplamente estudadas, são conhecidas desde 1960, quando mais de 100 mil perus morreram na Inglaterra após ingerirem ração contendo amendoim importado da África e América do Sul.

A partir da ração, foram isolados *Aspergillus flavus* e a toxina que este produzia (Aflatoxina – Toxina do *Aspergillus flavus*) (JAY, 2005). As aflatoxinas produzem necrose aguda, cirrose e carcinoma no fígado em diversas espécies animais: nenhuma espécie animal é resistente aos efeitos agudos das aflatoxinas, portanto é lógico assumir que humanos podem ser afetados da mesma forma (FORSYTHE, 2002). Aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos e carcinogênicos produzidos primeiramente pelo fungo filamentoso *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (YU, et al., 2004). As aflatoxinas de maior interesse são caracterizadas como B₁, B₂, G₁ e G₂, pela fluorescência de cor azul (B) ou verde (G) que ocorre quando visualizadas sob luz ultravioleta. Essas toxinas são usualmente encontradas juntas em diversos alimentos e rações e em várias proporções. Entretanto, a aflatoxina B₁ é a mais encontrada e a mais tóxica (FORSYTHE, 2002). Um total de 25 genes envolvidos na biosíntese da aflatoxina já foram identificados. A descoberta dos genes envolvidos na formação da aflatoxina aumentam o entendimento sobre a sua biosíntese (YU, et al., 2004).

Explorar a diversidade química dos fungos por uma metodologia químico-taxonomica, onde a pré-seleção de linhagens não toxicogênicas e não patogênicas é assegurada, é uma forma de identificação de potenciais fungos produtores de pigmentos como fonte de colorantes para a indústria alimentícia (MAPARI, et al., 2006).

2.5. Atividade Antioxidante

Tem aumentado às evidências de que muitos componentes alimentares apresentam benefícios funcionais adicionais ao corpo humano. Nossa preferência instintiva em ingerirmos alimentos naturalmente coloridos (como frutas e vegetais) ao invés de alimentos coloridos está relacionada ao pensamento de que a natureza pode nos oferecer, em nossa dieta, certas substâncias fito-químicas com micronutrientes e vitaminas, que estariam naturalmente presentes nesses alimentos. Antioxidantes naturais são agora conhecidos por sua possível capacidade de prevenir doenças ocidentais como câncer e doenças cardíacas, uma vez que essas doenças estariam associadas a falta da ingestão de frutas e vegetais na dieta. Apesar da maioria das pessoas saber que é recomendada a ingestão de pelo menos 5 porções de frutas e vegetais por dia, menos de 10% da população alcança essa meta (DOWNHAM & COLLINS, 2000).

Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (MENDEZ & RODRIGUEZ, 1997).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e os mecanismos de defesa do organismo. EROs em excesso podem originar no organismo, através de falha na respiração mitocondrial, ativação de polimorfismo nuclear, ácido araquidônico, ativação-inibição de sistemas enzimáticos, e catálise da ligação de ferro ou cobre (fatores endógenos) (NUÑEZ-SELLÉS, 2005).

O aumento de radicais livres, assim, está relacionado com o processo de envelhecimento do corpo humano, assim como o aparecimento de tumores e o dano tecidual (WILHEM-FILHO *et al.*, 2001). Dessa forma, já se conhece bastante sobre o papel dos radicais livres nos processos geração de doenças, buscando-se agora tentativas de intervenção que possam minimizar os danos causados. Tais intervenções precisam, obviamente, assumir a forma de um ataque aos radicais livres, e este se dá pelo uso de substâncias com atividade antioxidante (BALESTRIN, 2006). Os melhores produtos antioxidantes são os que impedem o excesso de EROs, através da estimulação do mecanismo de reparo antioxidante, ou através da doação ou captura de elétrons para a estabilização do radical livre (NUÑEZ-SELLÉS, 2005). Os antioxidantes podem definir-se como substâncias que, em uma concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável, retardam o estresse oxidativo, diminuindo a velocidade da reação ou prolongando o seu período de indução.

As lesões causadas pelos radicais livres nas células podem ser prevenidas ou reduzidas por meio da atividade de antioxidantes, sendo estes encontrados em muitos alimentos (PAPAS, 1999). Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função. Dentre os antioxidantes estão a vitamina C, a glutathione, o ácido úrico, a vitamina E e os carotenóides (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Estudos mostram que o licopeno – pigmento vermelho usualmente encontrado no fruto do tomate e em frutas vermelhas - protege moléculas de lipídios, lipoproteínas de baixa densidade, proteínas e DNA contra o

ataque dos radicais, tendo um papel essencial na proteção de doenças (SHAMI & MOREIRA, 2004).

Os componentes de muitos frutos vermelhos como uvas, cereja, mirtilos e framboesas são conhecidos por representarem um significativo papel na prevenção ou retardo do aparecimento de muitas doenças. Os componentes fenólicos presentes incluem: antocianinas, ácidos fenólicos, flavanóides e taninos (DOWNHAM & COLLINS, 2000).

Extratos que possuem atividade antioxidante usualmente contêm substâncias fenólicas, por exemplo, cumarinas, flavonóides, e catequinas (DAPKEVICIUS *et al.*, 1998). Ácidos orgânicos, carotenóides, tocoferóis, proteínas, taninos podem estar presentes e terem atividade como antioxidantes ou ter um efeito sinérgico com substâncias fenólicas. Estudos recentes vêm demonstrando que a atividade antioxidante está relacionada com o número de grupos hidroxilas livre (MOSADDIK *et al.*, 2004). Pode estar relacionado, também, com o tamanho da cadeia carbônica com ligações duplas conjugadas (SHAMI & MOREIRA, 2004). Duas substâncias, pestacin e isopestacin, foram obtidas de culturas líquidas de *Pestalotiopsis microspora*, um endofítico isolado de uma planta da família Combretaceae, *Terminalia morobensis*. Tanto pestacin como isopestacin apresentaram atividade antioxidante (STROBEL & CASTILLO, 2008).

Antocianinas são flavanóides que em frutas e vegetais lhes conferem uma coloração viva que vai do vermelho ao azul. O consumo de antocianinas na dieta é alto, devido à sua grande distribuição em vegetais. Baseado em muitos estudos com linhagens de células, estudos com animais e triagens clínicas em humanos, tem sido sugerido que as antocianinas possuem atividade antiinflamatória e anti-

carcinogênica, previnem doenças cardiovasculares, controlam obesidade e o aumento de diabetes, todas elas associadas em maior ou menor nível com sua potente capacidade antioxidante (HE & GIUSTI, 2010).

2.6. Atividade Toxicológica

Com o objetivo de avaliar a toxicidade de extratos, frações e substâncias através de um bioensaio com um sistema de *screening* rápido e sensível, novas metodologias foram desenvolvidas (GONZÁLES *et al.*, 2007), entre elas o ensaio empregando larvas *Artemia salina*.

Artemia salina é um organismo sensível a um amplo espectro de substâncias com atividades biológicas, sendo que o bioensaio utilizando este organismo foi inicialmente proposto por Michael e colaboradores (1956), onde se avaliou a toxicidade de inseticidas. O ensaio permite a avaliação de metabólitos e extratos tóxicos e também para a determinação da concentração que a porcentagem de mortalidade seja de 50% dos indivíduos (CL₅₀) (GONZÁLES *et al.*, 2007).

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em lagos de água salgada e salinas de todo o mundo, e como é utilizado como alimento para peixes, cistos (ovos) de *A. salina* são facilmente encontrados em lojas de aquaristas. Além disso, os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e a baixas temperaturas (MICHAEL *et al.*, 1956). Quando reidratados, os cistos de *A. salina*

eclodem em cerca de 24 horas, sendo que o ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em ensaios de toxicidade (McLAUGHLIN *et al.*, 1998).

Esse ensaio é mais utilizado em laboratórios com recursos limitados e fornece uma metodologia particularmente útil na detecção de substâncias bioativas. Tem sido utilizado para avaliar plantas com potencial atividade farmacológica, para guiar o isolamento de novas substâncias bioativas (GHISALBERTI, 2008).

2.7. CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia envolve uma série de processos de separação de misturas. A cromatografia acontece pela passagem de uma mistura através de duas fases: uma estacionária (fixa) e outra móvel. A grande variabilidade de combinações entre as fases móvel e estacionária faz com que a cromatografia tenha uma série de técnicas diferenciadas (DEGANI *et al.*, 1998).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE, é um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS *et al.*, 1993).

O grande avanço na cromatografia em coluna foi o desenvolvimento e a utilização de suportes com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência,

as quais tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido à sua baixa permeabilidade. As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e degaseificadas antes do uso. A bomba deve proporcionar ao sistema vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado (SKOOG & LEARY, 1992).

O detector mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, eletroquímicos, entre outros. O registro de dados pode ser feito através de um registrador, um integrador ou um microcomputador (DEGANI *et al.*, 1998).

O suporte mais comumente utilizado é a sílica. O uso de fases estacionárias líquidas adsorvidas a um suporte não tem grande aplicação devido à perda de fase estacionária, mas o uso de suportes modificados, os quais foram desenvolvidos como consequência do problema acima, possibilita a produção de uma imensa variedade de colunas com diferentes propriedades e tipos de seletividade. As fases assim obtidas são chamadas de quimicamente ligadas. Essas fases, dependendo da modificação feita ao suporte, podem atuar no modo normal, reverso ou ambos. Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar (YUNES & CALIXTO, 2001)

O sistema mais freqüentemente utilizado em Cromatografia Líquida (CL) é a fase reversa, o qual separa por partição e adsorção, através de grupos silanol não protegidos. Neste sistema, os compostos são adsorvidos à fase estacionária

(de menor polaridade) até serem eluídos pela fase móvel com adequada polaridade (DEGANI *et al.*, 1998).

A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. Tem sido utilizada em várias áreas da ciência, no acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, ferormônios, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos, dentre tantas outras aplicações (COLLINS *et al.*, 1993). A CLAE apresenta a capacidade de realizar separações de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Além de permitir excelente separação, esta técnica possibilita simultaneamente, separar e quantificar pigmentos sem requerer purificação excessiva dos extratos (YUNES & CALIXTO, 2001).

2.7. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia é o estudo da interação da energia com a matéria. Quando a energia é aplicada à matéria, ela pode ser absorvida, ser emitida, provocar uma variação química ou ser transmitida. A absorção de energia por moléculas que foram colocadas em um campo magnético forte é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A RMN é uma técnica de física experimental conhecida há cerca de 50 anos. Ela tem várias aplicações, não só na física, mas também na química, na biologia e na medicina. Na química e na

biologia, a RMN tem sido um poderoso auxiliar para o estudo das estruturas de moléculas complexas, como polímeros, proteínas, etc (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os núcleos de determinado elemento, incluindo os núcleos de ^1H e os núcleos de ^{13}C (carbono 13) comportam-se como se fossem ímãs girando em torno de um eixo. Quando uma substância contendo prótons ou núcleos de carbono 13 é colocado em um campo magnético muito forte e o irradia simultaneamente com energia eletromagnética de frequência apropriada, os núcleos do composto absorvem energia através de um processo chamado ressonância magnética. A absorção de energia é quantizada e produz um espectro característico para a substância denominado espectro de RMN (SOLOMONS & FRYHLE, 2009).

Os ímãs de campo alto utilizados nesse instrumento são ímãs supercondutores, ou seja, a espiral magnética do ímã supercondutor conduz eletricidade com resistência essencialmente zero. Para a espiral ser supercondutora, entretanto, ela deve ser mantida em temperaturas muito baixas. Se a temperatura do espiral se eleva constantemente, a resistência no fio cresce e é gerado calor e o campo magnético é extinto (SOLOMONS & FRYHLE, 2009).

Para manter a supercondutividade do espiral, o ímã inteiro é colocado no que é chamado de câmara de Dewar. A parte mais interna da câmara mantém o hélio líquido. Nessa câmara apóia-se o espiral do ímã supercondutor. Ao redor do compartimento de hélio está uma câmara concêntrica com nitrogênio líquido e ao redor desta, está um invólucro de vácuo. Em espectros de RMN, quanto maior o

imã, melhor o instrumento, maior sensibilidade da amostra e sinais mais definidos (SOLOMONS & FRYHLE, 2009).

O espectro de RMN fornece informações valiosas sobre a estrutura molecular que podem nos auxiliar a confirmar a identidade de uma substância ou elucidar a estrutura de uma substância desconhecida (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Além disso, uma das vantagens da técnica é que ela não degrada a amostra, permitindo que esta seja reutilizada em análises posteriores.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Isolar, analisar e investigar os fungos filamentosos endofíticos e epifíticos do fruto de *Theobroma grandiflorum*, cultiváveis que apresentem produção de pigmentos e investigar a viabilidade para o uso destes compostos na indústria alimentícia e cosmética.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolar e investigar fungos filamentosos endofíticos e epifíticos de frutos de *Theobroma grandiflorum* utilizando metodologia tradicional de isolamento de micro-organismos, com o cultivo direto em meio de cultura específicos.
- Caracterizar e identificar os fungos que apresentem produção de pigmentos e analisar esses compostos por meio das técnicas de Cromatografia em Camada Delgada de Sílica Gel (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (HPLC – High Performance/Pressure Liquide Chromatography) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).
- Fornecer subsídios para a viabilidade de fontes naturais produtoras de pigmentos, contribuindo efetivamente com o avanço na utilização de tecnologias apropriadas para aquisição de novas fontes de compostos naturais;

- Realizar ensaios de estabilidade dos pigmentos obtidos para avaliar a viabilidade para a sua utilização como colorante de alimentos e cosméticos, frente a variações de temperatura e pH.
- Avaliar o potencial para consumo humano dos pigmentos obtidos, realizando ensaios de toxicidade utilizando técnicas moleculares;
- Caracterizar os pigmentos obtidos em relação à presença de atividade antioxidante;
- Publicar os resultados obtidos: metabólitos identificados (pigmentos) associando a diversidade biológica com a diversidade química dos compostos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta, Isolamento, Identificação e Conservação

O conhecimento da comunidade endofítica começa com o isolamento seguido da caracterização destes micro-organismos. Para tanto, diferentes técnicas devem ser utilizadas, possibilitando o isolamento de grupos distintos com diferentes exigências nutricionais e taxa de crescimento (ARAÚJO *et al.*, 2002). Foram coletados frutos de *Theobroma grandiflorum* na Zona Rural da cidade de Manaus - Estado do Amazonas, e transportados para o laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana – FCA - Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Foram selecionados três indivíduos de *T. grandiflorum*. Para o isolamento dos fungos filamentosos presentes na casca (epicarpo e mesocarpo). Os protocolos de isolamento utilizados foram os descritos por Araújo *et al.*, (2002) com modificações.

Os frutos maduros, de aparência sadia e que tinham recém caídos do cupuaçuzeiro, foram imediatamente levados para o Laboratório de Genética de Micro-organismos - UFAM os quais foram lavados em água corrente cuidadosamente e após com água destilada esterelizado. Para cada um dos três frutos selecionados foram preparadas 10 placas de isolamento a partir do mesocarpo e seis placas para o isolamento dos endofíticos e epifíticos do epicarpo.

4.1.1. Isolamento de fungos filamentosos

Epicarpo. Com a ajuda de um bisturi esterelizado o epicarpo foi raspada até a camada clorofilada, abaixo dos pêlos ferrugíneos. O material dessa raspagem foi transferido para tubos do tipo *ependorf* de 2 mL contendo solução salina e pérolas de vidro. A solução foi homogeneizada em vórtex, para fragmentação e maceração do material vegetal. Após esse processo, os tubos passaram por centrifugação por 10 minutos a 1000 g. Após a centrifugação, alíquotas de 0,1 mL da solução sobrenadante foram inoculadas, em duplicatas, em cada um dos meios de cultivo utilizados, como descrito no item 4.4.

Mesocarpo. O mesocarpo foi raspado com ajuda de estilete ou bisturi esterelizado e os fragmentos foram dispostos diretamente nos meios de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA) e Ágar Saboraud (SB). Em cada placa foram inoculados 6 fragmentos de mesocarpo de cada fruto, e para cada fruto foram inoculadas 5 placas de cada meio de cultivo.

Todo o material foi incubado em estufas de crescimento microbiológico a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e/ou em temperatura ambiente.

Assim que começaram a aparecer os primeiros indícios de crescimento micelial, foram realizados os repiques, para cada isolado, com o auxílio de uma agulha de inoculação, em tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultivo da placa de isolamento. Após o crescimento nos tubos, foi realizada a purificação dos isolados. Cada um dos isolados foi inoculado em placa de Petri contendo meio de cultivo, após 7 dias de crescimento as colônias que não apresentavam produção de conídios foram raspadas, de forma a causar injúrias no micélio e

estimular, por choque mecânico, a produção de conídios. A cada colônia foram então acrescentados 5 mL de água destilada autoclavada, para obtenção de uma suspensão de conídios. Essa suspensão foi diluída (por técnica de diluição em série) e então inoculada em placa de cultivo para a obtenção de colônias monospóricas de cada isolado.

4.1.2. Conservação dos isolados

Após o isolamento e purificação dos isolados, os mesmos foram conservados pelo método de óleo mineral e/ou água destilada. O método de óleo mineral consiste em recobrir culturas jovens, desenvolvidas pelo método clássico em tubos de ensaio, com uma camada de óleo mineral esterilizado. Previne-se assim a desidratação do meio de cultura, reduzindo a atividade metabólica dos organismos preservados. Isso é possível pela redução do oxigênio disponível, uma vez que o óleo permite uma lenta difusão de gases (FIGUEIREDO, 2001).

A metodologia com água destilada (Método Castelani) consiste em cultivar cada isolado em placas de Petri contendo meio apropriado por tempo suficiente para que ocorra a produção de conídios, então cada colônia é fragmentada com o auxílio de um bisturi esterilizado. Os fragmentos são transferidos para tubos de criogênio com tampa de rosca e ao tubo é adicionada a água destilada até recobrir totalmente os fragmentos. Desta forma o material pode ser conservado em geladeira (-4°C) ou em temperatura ambiente.

4.1.3. Seleção dos isolados produtores de pigmentos

As linhagens foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e meio de cultura BDA acrescido de 2% de peptona microbiológica, e incubadas em temperatura ambiente. Após o crescimento, os isolados que apresentaram produção de pigmentos foram identificados taxonomicamente, classificados e selecionados para os ensaios químicos.

4.1.4. Identificação taxonômica clássica dos isolados

Para a identificação dos isolados produtores de pigmentos foi realizado o micro-cultivo e observados os aspectos macro e micro-morfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas. A identificação dos fungos baseia-se em observar as características da colônia (cor da superfície e reverso; textura; topografia), mas também as estruturas microscópicas produzidas, como conidiófaros, conídeos e esporos.

4.1.5. Identificação taxonômica molecular dos isolados

Todos os isolados que apresentaram produção de pigmento em cultivo foram encaminhados para a identificação molecular, mesmo após a caracterização morfológica. Esta foi realizada por meio de extração de ácidos nucleicos, PCR e seqüenciamento do DNA dos isolados. Para as reações de PCR foram utilizados *primers* de genes ribossomais eucariotos. Foram utilizados

primers para amplificação dos fragmentos de ITS do rDNA, onde estes fragmentos foram submetidos ao seqüenciamento de DNA e as seqüências foram contrastadas com as sequencias já depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio do programa *Blast*.

Os isolados foram cultivados em meio BD para a obtenção do micélio e posterior extração de DNA total. A extração de DNA se procedeu pelo método fenol-clorofórmio e após a extração o DNA total passou por purificação com o auxílio do *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE). Todo o material foi encaminhado para sequenciamento na Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM, da Universidade Federal do Amazonas, sob direção do Profº. Dr. Spartaco Astolfi Filho. O sequenciamento foi realizado em um equipamento *MegaBACE™ 1000 DNA Sequencing System* (Amersham Biosciences).

4.1.5.1 Extração de Ácidos Nucléicos

Para a extração de ácidos nucleicos, as linhagens foram crescidas em BD, por 7 dias sob agitação (90 rpm) a 25°C. O micélio foi filtrado em gaze, lavado com água destilada esterilizada e pesado. O micélio foi macerado com nitrogênio líquido e transferido para um tubo e para cada 0,5 g de micélio foram adicionados 800 µL de Tampão de extração (descrito no item 4.4.8). Essa mistura foi incubada por 45 minutos em banho-maria a 65°C. Após o período de incubação, foi adicionado 800 µL de fenol, as fases foram misturadas e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida cuidadosamente para outro

tubo, onde foi acrescentado igual volume de clorofane (item 4.4.6). A solução foi misturada por inversão cuidadosa e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. A fase aquosa foi novamente transferida para outro tubo e a ela foi adicionado igual volume de clorofil (item 4.4.7) e repetiu-se a centrifugação anterior. Para a precipitação do DNA a fase aquosa foi transferida para um tubo contendo 2 volumes de etanol absoluto gelado (-20°C) e 1/10 do volume de NaCl 3M. O tubo foi incubado *overnight* em freezer e então centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 300 µL de etanol 70% e repetiu-se a centrifugação anterior. O sobrenadante foi descartado e após a secagem do DNA à temperatura ambiente, este foi ressuspendido em 100 µL de H₂O destilada.

O DNA extraído foi quantificado com o auxílio de fluorímetro e sua integridade foi avaliada em gel de agarose 0,7%. O DNA extraído foi mantido a -20°C.

4.1.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações foram realizadas em volume final de 25 µL contendo: 20 ng de DNA; 2,5 mM de MgCl₂; 0,25 mM de dNTP; 2,0 mM de cada *primer*, ITS 1 (5' TTC CGT AGG TGA ACC EGC GG 3') e ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (Invitrogen); 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 10mM de Tampão Tris-HCl pH8,3 e 50 mM de KCl. As reações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de 94°C por 45 seg, 55°C por 55 seg e 72°C por 35 seg; e uma extensão final de 10 min à

72°C. Todas as reações foram realizadas em termociclador MasterCycler (Eppendorf). Para a análise dos produtos das PCRs, 5 µL de cada reação foram submetidos em gel de agarose a 1,3%.

4.2. Análises Bioquímicas

4.2.1. Ensaios de condições de cultivo

Durante o processo de seleção dos isolados produtores de pigmentos, o isolado *Penicillium purpurogenum* CIAM045 foi selecionado por apresentar uma produção mais intensa do pigmento em meio líquido e sólido. Com o intuito de avaliar as melhores condições de cultivo para a produção do pigmento vermelho produzido pelo isolado de *P. purpurogenum* CIAM045, ensaios com diferentes meios de cultivo e condições ambientais foram realizados. Dessa forma foi possível determinar qual seria a melhor e mais econômica forma de cultivo para a produção do pigmento.

Na primeira etapa ensaiou-se a produção do pigmento em meio Sabouraud Líquido, Caldo Batata Dextrosado, Caldo Batata Dextrosado acrescido de Peptona (2%) e Meio Aveia Líquido (40%). Na segunda etapa ensaiou-se a mudança de fonte de carboidratos, alterando-se a composição do meio Batata Dextrose, substituindo a dextrose por sacarose e D-arabnose. Também foram ensaiados o meio Caldo Batata sem a adição da dextrose e meio Aveia líquido com a adição de 10 % de dextrose. Esses meios foram inoculados com dois fragmentos de agarose do cultivo em placa de Petri com Meio Batata Dextrose

Ágar do isolado *P. purpurogenum* CIAM045 e incubados na ausência total de luz à 28°C e com regime de fotoperíodo de 12hs em temperatura de 28°C. Outros ensaios realizados foram para avaliar se havia diferença na produção do pigmento se este era cultivado em meio estático ou sob agitação (135 rpm), à 30°C e ausência de luz.

4.2.2. Obtenção dos pigmentos

Os isolados que apresentaram produção de pigmentos foram inoculados em meio líquido - BD ou Sabouraud - para fermentação. Os inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 a 1000 mL, contendo de 250 a 500 mL do meio específico e incubados em condições favoráveis para a produção do composto, dependendo de cada isolado e de suas características de cultivo, que para a melhor produção do pigmento, tais como, composição química do meio de cultivo, temperatura de incubação, condições de luminosidade, entre outros.

Após o período de incubação necessário para a produção do pigmento (de 7 a 15 dias), o cultivo foi filtrado em gaze esterelizado e filtro de papel tipo Whatman para a remoção do micélio. O filtrado, foi então, submetido a partição (Item 4.2.4).

4.2.3. Ensaios de estabilidade dos extratos pigmentados

Ensaios de estabilidade dos pigmentos em diferentes temperaturas foram realizados em tubos de ensaio contendo 10 mL do extrato do pigmento. Os tubos

foram individualmente incubados em banho-maria a 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C, por 10 minutos. Após o período de incubação, todos os tubos foram retirados do banho e resfriados. Os tubos resfriados foram analisados em relação a mudanças de coloração.

Para os ensaios de estabilidade em diferentes pHs foram preparados tubos de ensaio contendo 10 mL do extrato do pigmento. Foi ajustado o pH dos extratos para 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 e 14.0, cada tubo foi mantido em temperatura ambiente e observado por 10 minutos para a avaliação de mudança ou não da cor do pigmento ou de sua intensidade pudesse ser realizado.

Além desses ensaios, tubos de ensaio contendo 10 mL do extrato de pigmento fúngico foram incubados em diferentes situações de estresse como forno de micro-ondas até a fervura e congelamento em freezer (-20°C).

4.2.4. Partição líquido - líquido

Os extratos que apresentaram estabilidade sob pHs, e temperaturas diferentes foram submetidos à partição. Para a o fracionamento do extrato bruto e início da purificação do pigmento utilizou-se a metodologia de: Partição Líquido-Líquido (PLL) com Diclorometano (DCM)/Acetato de etila (AcOEt)/Butanol (BuOH) (Figura 05); coluna cromatográfica filtrante (CCF) utilizando fase estacionária (FE) Amberlite e como fase móvel (FM) gradiente de H₂O/MeOH/Acetona; coluna cromatográfica filtrante com fase estacionária Florisil e fase móvel gradiente de DCM/AcOEt/Acetona; coluna cromatográfica aberta com fase estacionária de poliamida 6 em modo reverso de eluição, gradiente H₂O:MeOH; e fracionamento

em cartuchos Sep-pak C18, gradiente H₂O:MeOH (a fase BuOH da Partição líquido-líquido também foi submetida a este fracionamento). O processo de partição líquido-líquido foi realizado em funis de separação de vidro. Os extratos obtidos após a filtração do cultivo líquido foram extraídos três vezes com cada um dos solventes utilizados na partição. Sendo que para as primeiras partições partiu-se de um volume inicial de extrato de 250 mL, para a partição maior para a obtenção das frações para as análises em CLAE usou-se 1 L de extrato pigmentado. As primeiras partições foram realizadas com solventes de polaridade crescente, como diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), visando uma separação (semipurificação) das substâncias através de suas polaridades. O volume de solvente utilizado variou conforme o volume do extrato a ser fracionado. Esse procedimento visa uma separação preliminar dos constituintes químicos para facilitar o seu posterior fracionamento cromatográfico.

Também foram realizados ensaios de partição e extração do pigmento em colunas Filtrantes, usando como fases estacionárias Poliamida 6 (Fluka), Florisil (MERK); e Amberlite. As frações obtidas pela partição/e ou extração foram submetidas à Cromatografia em Camada Delgada Comparativa.

Para a evaporação dos solventes, utilizou-se evaporador rotativo a vácuo (FISATOM). Os solventes utilizados para as extrações, partições, cromatografias em coluna aberta e cromatografias em camada delgada possuíam grau comercial de pureza, sendo previamente destilados no Laboratório de Bioprospecção, Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.2.5. Análise cromatográfica em camada delgada dos extratos

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de fácil execução, rotineiramente usada no laboratório de química orgânica. Devido à conveniência e rapidez a técnica pode ser usada para: estabelecer se duas substâncias são idênticas, verificar a pureza de um composto, determinar o número de componentes em uma mistura e determinar o solvente apropriado para separação em uma coluna cromatográfica.

Para a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), utilizou-se cromatofolhas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência UV 254, com 0,20 mm de espessura (MACHEREY – NAGEL -MN). A eluição das cromatofolhas foi realizada com vários solventes, em diferentes proporções. Para as revelações dos cromatogramas obtidos em CCDC, utilizaram-se vapores de iodo resublimado P.A. (CRQ), solução de Sulfato Cérico (VETEC), solução de anisaldeído sulfúrico (4-metoxibenzaldeído) (VETEC), solução de Cloreto Férrico (VETEC), e solução de DPPH (2,2 Diphenil-1-picrilhidrazil) (SIGMA ALDRICH). Também utilizou-se irradiação de luz UV (254 e 365 nm).

As amostras foram aplicadas nas cromatoplasas em forma de soluções (a 1-10% em solvente volátil) a cerca de 1 cm da base inferior, com o auxílio de um tubo capilar. A placa, com a base inferior posicionada para baixo, foi então mergulhada no solvente selecionado, mantido em cuba de vidro fechada. Durante a corrida do solvente o sistema permaneceu fechado, para garantir saturação da câmara pelo vapor do solvente. Após o desenvolvimento as cromatoplasas foram retiradas das cubas e espera-se que o solvente evapore, naturalmente, para a

secagem da placa. Após a secagem total das cromatoplasas, estas são reveladas por métodos físicos ou químicos.

Essa metodologia também foi utilizada para a determinação dos procedimentos para o fracionamento e para a análise das frações obtidas das técnicas de fracionamento, indicando a similaridade entre as frações, o nível de pureza, e as possíveis classes de metabólitos presentes.

4.2.6. Análises e purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após os procedimentos de partição líquido-líquido e colunas filtrantes, as frações foram analisadas por CLAE, em coluna de fase reversa, Phenomenex C18, 5 µm; 100Å; 250 mm/4,6 mm e coluna de fase reversa, Phenomenex CN, 5 µm; 100Å; 250 mm/4,6 mm. A técnica de CLAE foi utilizada tanto para a identificação do composto como para a purificação das frações. A fase móvel a ser utilizada depende das condições químicas dos solventes empregados em cada uma das frações testadas, sendo que os solventes de fase móvel serão de Grau-CLAE, ultra puros. Inicialmente foram testados como fase móvel Metanol (MeOH) e Acetonitrila (ACN).

Os solventes utilizados foram degaseificados e ultra filtrados, com grau espectroscópico, da TEDIA. O equipamento utilizado possui um Degaseificador DGU-14^a (Shimadzu), com Injetor automático modelo SIL-10AF (Shimadzu). Utiliza duas Bombas do modelo LC 6AD (Shimadzu), um Coletor FRC 10^a (Shimadzu) e a Interface possui o modelo SCL 10AVP (Shimadzu). O Detector

possui arranjo de diodos, modelo SPD-M20A (Shimadzu). Tanto as colunas analíticas (250 x 4,5 mm), semi-preparativas (250 x 10 mm) e pré-colunas utilizadas são da marca Phenomenex, com partículas de 100 Å.

Para a evaporação dos solventes de cada fração foi utilizado um evaporador rotativo a vácuo. Após a secagem das amostras estas foram submetidas à cromatografia em camada delgada, para confirmação dos resultados obtidos na partição anterior.

4.2.7. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Após a separação e isolamento das substâncias dos extratos de pigmentos por CLAE, estas foram submetidas ao método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , e ^{13}C . Espectros bidimensionais (COSY, HMQC, HSBC) também foram realizados quando necessários. Espectros de RMN foram registrados em espectrômetros: Varian Inova – 500 MHz para o núcleo de ^1H ; Bruker AC 125 MHz para o núcleo de ^{13}C . Os deslocamentos químicos foram dados em ppm (partes por milhão), tendo como referência interna o próprio solvente, no caso o DMSO-d₆.

4.3. Ensaios Biológicos

4.3.1 Ensaio antioxidante - metodologia empregando o DPPH

A avaliação do potencial antioxidante foi realizado segundo metodologia de Brand-Williams e colaboradores (1995) modificada. O método de avaliação da atividade antioxidante empregando o DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (SIGMA ALDRICH) por substâncias antioxidantes, ocorrendo uma diminuição na absorção da luz no comprimento de onda de 517 nm.

A metodologia utilizada empregou a comparação da variação da absorbância do DPPH na presença dos extratos com a variação da absorbância do DPPH em diferentes concentrações do ácido ascórbico.

Para a determinação da curva da absorbância do DPPH na presença do ácido ascórbico foram utilizadas 10 μL das concentrações de 0; 22; 44; 88; 132 e 136 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido ascórbico (VETEC), nas quais foram adicionados 990 μL solução de DPPH na concentração de 0,28 mg.mL^{-1} . A absorbância em 517 nm destas soluções foi medida em espectrofotômetro (UV-VIS -AquaMate), logo após a adição do DPPH e após 30 minutos da adição. A variação da absorbância foi determinada e utilizada para o cálculo de parâmetros da regressão linear da curva do ácido ascórbico.

Após a obtenção da curva de calibração e calculada a sua linearidade, foram adicionados 10 μL de uma solução dos extratos na concentração de 0,5 mg.mL^{-1} nas soluções de 990 μL DPPH (0,28 mg.mL^{-1}) em triplicata. Foi realizada a leitura da absorbância (517 nm) no espectrofotômetro das soluções logo após a adição de DPPH, e após 30 minutos de reação, a leitura foi realizada novamente. A variação da absorbância dos extratos é comparada com o ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante. Para calcular a

equivalência do potencial antioxidante dos extratos, foi utilizada a seguinte equação:

$$[AA] \text{ Equivalente} = (|\Delta ABS| - a) / b$$

Sendo:

a = coeficiente linear da curva de ácido ascórbico

b = coeficiente angular da curva de ácido ascórbico

4.3.2. Ensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina*

Para o ensaio de toxicidade, utilizou-se como meio de crescimento água do mar sintética (Sera premium), (pH entre 8-9), e para a eclosão, adicionam-se 10 mg de cistos de *A. salina*. As condições de crescimento utilizadas foram: temperatura de 25 a 28° C, e iluminação em lâmpada fluorescente, durante 48 horas. Após esse período, as larvas são repassadas para placas Elisa de 24 poços, sendo distribuídas 10 larvas de *A. salina* para cada poço. Em cada placa, houve o controle da salina, realizado em triplicata, o controle do solvente utilizado, também realizado em triplicata e os poços que receberam o extrato a ser testado, também em triplicata. As placas com as larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente. Após esse período, avaliou-se o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto no ensaio.

O procedimento utilizado foi similar ao descrito por Sam (1993). Foram realizadas baterias com diversas concentrações finais dos extratos estimados (500, 250, 125, 60, 30 e 15µg/mL). Partiu-se de uma solução-mãe da fração

butanólica do extrato pigmentado de *P. purpureogenum* CIAM045 solubilizada em DMSO (10 mg/mL) e do extrato puro exudado de *P. purpureogenum* CIAM045. Diferentes volumes dessa solução foram adicionados à água do mar sintética, a fim de obter as concentrações finais. Para os ensaios com o extrato puro exudado do cultivo de *P. purpureogenum* CIAM045, utilizou-se volumes diferentes do próprio extrato (100 µL, 50µL, 25µL, 12µL, 6µL, 3µL). Tendo como volume final 2 mL em microplaca de 24 poços. Os ensaios de toxicidade foram realizados em triplicata com 10 micro-crustáceos por experimento (Figura 22). Após 24 horas contou-se o número total de microcrustáceos e o número de mortos por experimento (em triplicata), utilizando como controle o solvente (DMSO 5%) e como controle negativo utilizou-se 2 mL de água do mar sintética. Foi realizada análise estatística (probitos) do n° de micro-crustáceos mortos em cada experimento e o intervalo de confiança 95%.

4.3.3. Ensaios de atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana dos extratos dos cultivos fúngicos contendo o pigmento foram realizados segundo a metodologia de cavidade-placa. Os extratos foram obtidos após o cultivo do isolado em meio líquido por 10 dias. O cultivo foi filtrado em filtro de gaze esterelizado para a remoção do micélio e então filtrado novamente em filtro de membranas de éster-celulose de 0,22 µm (TPP Spritzen- Syringe-Filter) para a remoção de conídios. Os ensaios foram realizados em triplicatas e para se obter maior confiabilidade dos resultados foram realizados duas vezes. Os micro-organismos testadores foram inoculados em placas de Petri

contendo o meio de cultura adequado através da técnica de *spread-plate*, onde são feitas cavidades circulares. Em seguida, adicionam-se nas cavidades os extratos de pigmentos. Ao final do período de incubação, procedeu-se a verificação da formação dos halos de inibição de crescimento e em caso de atividade positiva, a verificação do diâmetro do halo com o auxílio de uma paquímetro. Os organismos testadores foram *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Candida albicans*. As cepas utilizadas foram cedidas pela Coleção de Culturas Bacteriológicas do Laboratório de Biotecnologia – Bloco G, do Programa de Pós-Graduação Em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas. O meio de cultivo utilizado foi o Ágar Mueller-Hinton para as bactérias e Ágar Sabouraud para *C. albicans*. As placas foram incubadas a uma temperatura de 37°C.

4.3.4. Metodologia molecular de caracterização de produção de micotoxinas

As linhagens que apresentarem produção de pigmentos estáveis em pH, temperatura, incidência de luz foram testadas quanto a presença de genes precursores de micotoxinas. Foi levado em consideração o gênero ao qual pertence o isolado estudado para a prospecção dos genes conhecidos no *táxon*. Os genes analisados formam: da micotoxina patulina produzida por *Aspergillus* e *Penicillium* (PATERSON, *et al.*, 2006); da ocratoxina A produzida por *Penicillium* e *Aspergillus* (BOGS, *et al.*, 2006) e; da aflatoxina produzida por *Aspergillus* (CARY, *et al.*, 2005). Na Tabela 01 estão descritos os *primers* que foram utilizados, sintetizados por Alpha DNA (Quebec).

Tabela 01. Sequencia de *primers* utilizados para a identificação molecular de produtores de micotoxinas

Gene	Descrição	Sequência
<i>idh</i>	Patulina – desidrogenase isoeopoxydon (PATERSON, <i>et al.</i> , 2006)	idh1 – 5'CAA TGT GTC GTA CTG TGC CC3' idh2 – 5' ACC TTC AGT CGC TGT TCC TC 3'
<i>otapks</i> PN	Ocratoxina A – síntese do poliquetídeo (BOGS, <i>et al.</i> , 2006)	For - 5'TAC GGC CAT CTT GAG CAA CGG CAC TGC C 3' Rev - 5' ATG CCT TTC TGG GTC CAG TA 3'
<i>otanps</i> PN	Ocratoxina A – síntese do peptídeo	For - 5'AGT CTT CGC TGG GTG CTT CC 3' Rev 5' CAG CAC TTT TCC CTC CAT CTA TCC 3'
<i>aflR</i>	Gene regulador de aflatoxina (CARY, <i>et al.</i> , 2005)	aflR - 5'CGA TGC GYM CGM CGT GGY CTS YCT TGC GAG 3' aflR - 3'ACR TAC TCA TCC TSK GCG CAG CGG CA 5'
<i>stcE</i>	Esterigmatocistina (CARY, <i>et al.</i> , 2005)	stcE - 5'CGY CCC AAM AGY AYY GTS RTC GC 3' stcE - 3' TTC TCA AAG TGG AWC TTG CGC AC 5'
<i>nor1</i>	Ácido norsolorinico (GEISEN, 1996)	nor1 For – 5' ACC GCT ACG CCG GCA CTC TCG GCA C 3' nor1 Rev – 5' GTT GGC CGC CAG CTT CGA CAC TCC G 3'
<i>ver1</i>	Versicolorina (GEISEN, 1996)	ver1 – For 5' GCC GCA GGC CGC GGA GAA AGT GGT 3' ver1 – Rev 5' GGG GAT ATA CTC CCG CGA CAC AGC C 3'
<i>omtA</i>	O-metilesterigmatocistina (GEISEN, 1996)	omt1 For 5' GTG GAC GGA CCT AGT CCG ACA TCA C 3' omt1 Rev 5' GTC GGC GCC ACG CAC TGG GTT GGG G 3'
For: primer forward, Rev: primer reverse		

As condições de ciclagem foram às mesmas descritas na literatura com algumas modificações. Para o par de *primers idh1* e *idh2* (PATERSON, *et al.*, 2006) usou-se um ciclo de 96°C por 30 s, 52°C por 45s e 72°C por 90s, com 30 repetições. Para os *primers otapks* PN e *otanps* PN (BOGS, *et al.*, 2006) a ciclagem utilizada foi de 95°C por 30 s, 60°C por 40s e 72°C por 60s, com 35 repetições. Já para os *primers* descritos por Geisen (1996), *nor1*, *ver1* e *omtA*, a ciclagem utilizada foi de 95°C por 30 s, 65°C por 60s e 72°C por 60s, com 30

repetições. Para *afIR* e *stcE*, *primers* descritos por Cary, *et al.* (2005), utilizou-se ciclagem de 94°C por 30 s, 68°C por 45s e 72°C por 45s, com 35 repetições.

Para a preparação das reações de PCR foram utilizadas as seguintes concentrações para cada reação: 1,0 µL de DNA da amostra (0,5 µg/ µL) 1,5 µL de MgCl₂ (50mM/µL), 1,0 µL de dNTP mix a (2,5 mM de cada nucleotídeo), 0,5 µL de cada primer do par (20mM/ µL), 2,5µL de Tampão de PCR 10X, 0,1 µL de Taq DNA Polimerase (5u/ µL) (CENBIOT^{ENZIMAS}, Porto Alegre) e 17,9 µL de água deionizada esterelizado. As reações foram realizadas em termociclador MasterCycler (Eppendorf).

4.4. Meios de Cultivo e Soluções

4.4.1. Àgar Batata Dextrose

Batata	200 g
Dextrose	10 g
Ágar	15 g

A batata foi lavada em água corrente, cortada em pedaços e cozida em 500 mL de água destilada. Após o cozimento total da batata, a água da fervura foi filtrada em peneira para separar a batata da água. À água foram acrescentados a dextrose e o ágar. O volume foi completado para 1000 mL com água destilada.

Para o preparo do meio Caldo Batata Dextrose (BD) segue-se o mesmo procedimento, exceto pela adição do ágar ao meio de cultivo.

4.4.2. Ágar Sabouraud

Peptona	10 g
Dextrose	40 g
Ágar	15 g

O volume foi completado para 1000 mL com água destilada.

4.4.3. Solução NaCl 0,85% (p/v)

NaCl	8,5 g
H ₂ O destilada	1000 mL

A solução foi distribuída em frascos, 9 mL cada, e autoclavada. A solução foi mantida à 4°C.

4.4.4. Ácido Etilenodinitrilotetracético sal dissódico (EDTA) 0,5M pH 8,0

EDTA	182,012 g
------	-----------

O EDTA foi dissolvido em 200 mL de água destilada. Ajustou-se o pH com NaOH (pastilhas), no agitador, até atingir o pH 8,0. Depois que o EDTA foi dissolvido completamente o volume foi ajustado para 1000 mL com água destilada. A solução foi autoclavada e mantida à 4°C.

4.4.5. Tampão Tris-HCl pH 8,0 1M

Trizma base	121,14 g
-------------	----------

O Trizma base foi dissolvido em 200 mL de água destilada. Ajustou-se o pH com HCl, no agitador, até atingir o pH 8,0. Depois que o Trizma foi dissolvido completamente o volume foi ajustado para 1000 mL com água destilada. A solução foi autoclavada e mantida à 4°C.

4.4.6. Clorofane

Foram misturados um volume de clorofórmio para um volume de fenol (1:1).

4.4.7. Clorofil

O clorofórmio e o álcool isoamílico formam misturados na proporção 24:1 (v/v).

4.4.8. Tampão de extração

TrisHCl 1M pH 8,0	20 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	4 mL
NaCl 5M	5 mL
SDS 10%	4 mL
H ₂ O destilada	100 mL

A solução foi estocada em frasco escuro à temperatura ambiente.

4.4.9. Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base	108 g
Ácido bórico H_3BO_3	55 g
EDTA 0,5M pH 8,0	40 mL

O volume foi completado para 1000 mL com água destilada. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.4.10. Tampão da amostra

Azul de bromofenol	25 mg
Ficol	1,5 mg
H ₂ O destilada	10 mL

Foi distribuído 1,5 mL de tampão em tubos e estes foram mantidos a 4°C.

4.4.11. Gel de agarose (0,7% e 1,4%)

Agarose (Invitrogen)	0,7 g (0,7%) ou 1,4 g (1,4%)
TBE 1X	100 mL

4.5. Esterilização

Os meios de cultura e soluções foram autoclavados por 15 minutos com pressão interna de 1,2 kgf/cm² (121°C).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Coleta, Isolamento e Identificação dos Isolados Fúngicos

A coleta dos frutos de *T. grandiflorum* foi realizada em Fevereiro de 2009 em uma propriedade agrícola na Zona Rural do Município de Manaus - AM, situada na Zona Leste da Cidade no Ramal do Ipiranga. Esta propriedade foi selecionada por utilizar exclusivamente o método de cultivo adensado orgânico. Ao final do processo de isolamento obteve-se um total de 207 isolados, como descrito na Tabela 02.

Tabela 02. Resultado do isolamento de frutos de *Theobroma grandiflorum*

	Fruto A	Fruto B	Fruto C	Total
Epicarpo	20	16	5	41
Mesocarpo	66	83	17	166
Total	86	99	22	207

5.1.1. Identificação taxonômica dos isolados

Os isolados identificados a nível de gênero por métodos clássicos estão apresentados na Tabela 03. Os isolados identificados por métodos morfológicos e os que não puderam ser identificados por ausência de estruturas reprodutivas ou ambigüidade de resultados foram selecionados para a identificação molecular. Os isolados já identificados por taxonomia molecular encontram-se listados na Tabela

04. No Apêndice 01 e 02 encontram-se as sequências das regiões ITS e o resultado do contraste das sequências com o programa BLAST no GenBank.

Tabela 03. Resultado da identificação taxonômica por método clássico de caracterização morfológica.

Gênero/Classificação	Isolados
<i>Penicillium sp</i>	82
<i>Trichoderma sp</i>	44
<i>Aspergillus sp</i>	11
<i>Paecilomyces SP</i>	8
<i>Pestalotiopsis sp</i>	11
Isolados com conídios ovais não identificados	46
Isolados com conídios falciformes não identificados	5
Total	207

5.1.2 Seleção dos isolados produtores de pigmentos

Do total de 207 fungos isolados, 85 foram selecionados por produzirem algum tipo de pigmento ao serem cultivados em meio BDA e/ou BD acrescido de peptona (Apêndice 03). Os pigmentos variaram em cores de amarelo, marrom, laranja a vermelho e em vários tons diferentes (Figura 01).

Tabela 04. Listagem de isolados identificados por taxonomia molecular.

AEAM11043	<i>Penicillium sp.</i>
AEAM11043B	<i>Penicillium sp.</i>
AEAM11053	<i>Fusarium cf. solani</i>
AEAM11153	<i>Penicillium sp.</i>
AIAM 10SET	<i>Penicillium chrysogenum</i>
AIAM006	<i>Fusarium sp</i>
AIAM008	<i>Fusarium cf. solani</i>
AIAM010	<i>Penicillium chrysogenum</i>
AIAM012	<i>Fusarium cf. solani</i>
AIAM017	<i>Fusarium cf. solani</i>
AIAM023	<i>Fusarium cf. solani</i>
AIAM027	<i>Fusarium solani</i>
AIAM028	<i>Penicillium chrysogenum</i>
AIAM034	<i>Penicillium glabrum</i>
AIAM045	<i>Penicillium purpurogenum</i>
AIAM047	<i>Fusarium cf. solani</i>
AIAM050	<i>Fusarium cf. solani</i>
AIAM051	<i>Bionectria ochroleuca</i>
AISB010	<i>Nectria haematococca</i>
AISB018	<i>Trichoderma asperellum</i>
AISB029	<i>Acremonium sp</i>
AISB035	<i>Penicillium commune</i>
AISB044	<i>Bionectria ochroleuca</i>
BEAM11015	<i>Talaromyces ruber</i>
BENA21013	<i>Penicillium sp</i>
BIAM056	<i>Penicillium sp.</i>
BISB019	<i>Penicillium sp</i>
BISB028	<i>Pestalotiopsis sp.</i>
BISB036	<i>Penicillium sp</i>
CISB022	<i>Gibberella fujikuroi</i>

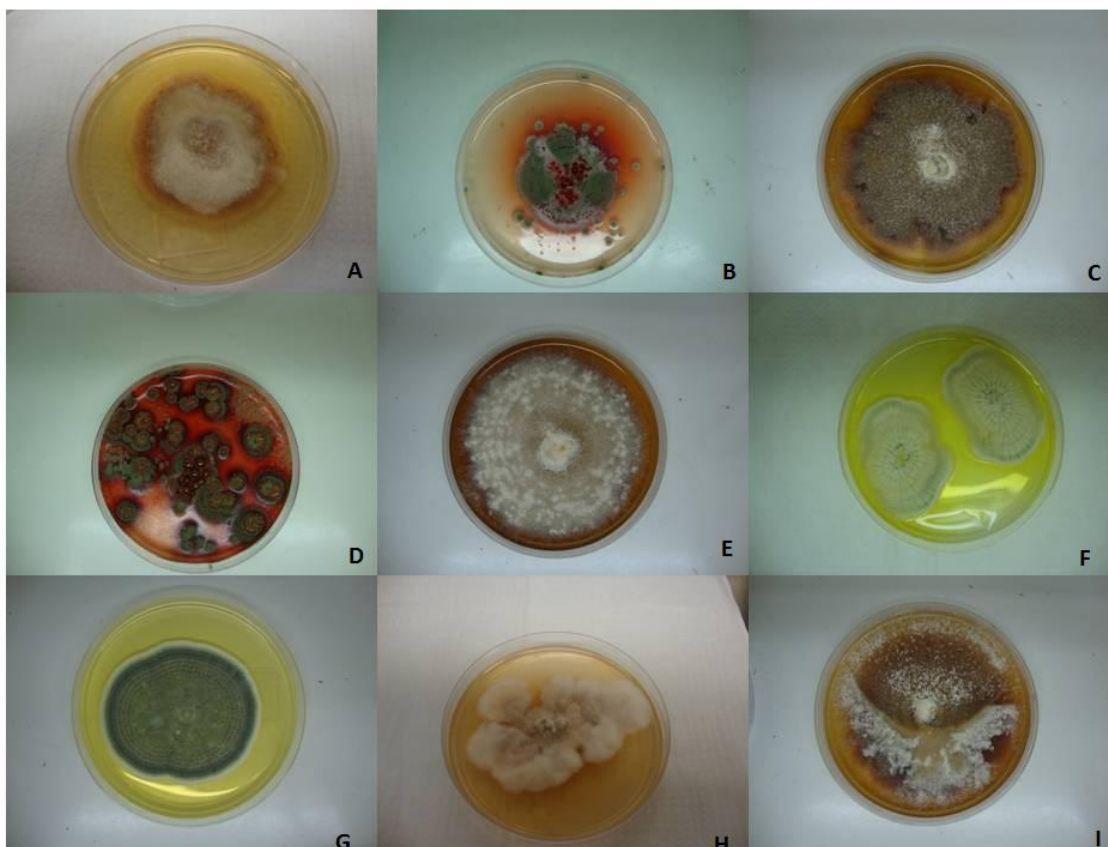


Figura 01. Isolados de *T. grandiflorum* selecionados por apresentarem produção de pigmentos durante o cultivo em BDA. **A-** AIAM030; **B-** CIAM042; **D-** AIAM044; **F-** AIAM010setor; **G-** BIAM030; **H** – AISB044; **C e I** BISB052, em BDA acrescido com peptona; **E** – BISB052 em BDA acrescido com extrato de levedura.

5.2 Análises Bioquímicas

As análises foram realizadas inicialmente com os extratos brutos dos isolados CIAM042, CIAM045 e CIAM2001 (*Penicillium purpurogenum*) produtores de um pigmento vermelho e AIAM 006 (*Fusarium sp.*) produtor de um pigmento marrom (Figura 02). Dentre os micro-organismos já conhecidos como produtores de pigmentos considerados com grande potencial para a produção comercial destaca-se o *P. purpurogenum* (DUFOSSÉ, 2006), um fungo filamentoso que junto com outras espécies relacionadas pertence ao subgênero *Biverticillium*, que

compreende um grande numero de espécies conhecidas por sua abundante produção de pigmentos (ROBERTS & WARREN, 1955).

5.2.1 Obtenção do pigmento

Os extratos brutos com pigmentos foram obtidos a partir do cultivo em meio líquido (BD) dos isolados *P. purpurogenum* CIAM042, *P. purpurogenum* CIAM045, *P. purpurogenum* CIAM2001 e *Fusarium sp.* AIAM006. Após 7 a 10 dias de cultivo estático, com fotoperíodo de 12hs, em temperatura ambiente (27 ± 2). Após o período de incubação, este foi filtrado em papel filtro para a remoção do micélio.

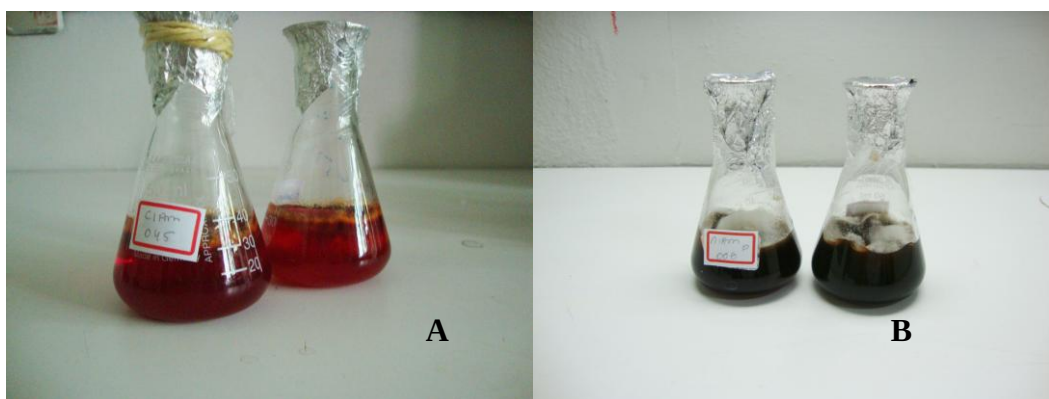


Figura 02. Isolados produtores de pigmentos em meio de cultivo líquido BD. **A:** CIAM045, *P. purpurogenum*, e **B:** AIAM006, *Fusarium sp.*

5.2.2. Ensaio de condições de cultivo

No ensaio de condições de cultivo do isolado *P. purpurogenum* CIAM045 observou-se que quando o cultivo foi realizado em Caldo Batata Dextrose estático ou em agitação. Não houve produção do pigmento no cultivo sob agitação,

apenas no cultivo estático, observou-se também que o cultivo apresentou pouco crescimento sob agitação, indicando que esta interferiu no crescimento e formação da colônia. Entretanto, tanto o cultivo em fotoperíodo de 12hs como em ausência de luz, apresentaram produção do pigmento vermelho. Para o cultivo em Caldo Batata Dextrosado e Caldo Batata Dextrosado acrescido de peptona, observou-se que não houve a produção do pigmento na presença de peptona (Figura 03), indicando que de alguma forma a presença da peptona bloqueou a produção do pigmento. Observa-se que quando o objetivo do cultivo de *P. purpurogenum* CIAM045 for a produção do pigmento, este deve ser realizado em cultivo estático, mas que a incidência ou não de luz, não irá interferir na produção. Sendo assim, pode-se produzir o pigmento vermelho em fermentadores com pouca agitação e sem a necessidade de iluminação do cultivo.

Quando foram testadas fontes de carbono diferentes para a produção do pigmento de *P. purpurogenum* CIAM045 (Figura 04), observou-se que não houve produção do mesmo quando o cultivo foi realizado em Aveia (40%), Caldo Batata sem a presença de dextrose (BATATA). Houve produção do pigmento quando o cultivo foi realizado em Extrato de Malte (10%), Caldo Batata acrescido de sacarose (10%), Caldo Batata acrescido de D-arabinose (10%), Aveia acrescido de Dextrose (10%) e Caldo Batata Dextrosado, sendo que neste último obteve-se o melhor resultado com maior intensidade de produção do pigmento sendo exudado no meio de cultivo. Esses resultados indicam que há a necessidade da presença de fontes de carbono. Está relacionada com a produção de pigmento. Boonyapranai e colaboradores (2008) ao ensaiarem quais as melhores condições de cultivo para a produção de pigmentos por *Fusarium verticillioides* obtiveram

resultados semelhantes, onde a melhor produção ocorreu em meio Batata (20% p/v) com glucose (20g/L) como fonte de carbono.

Observou-se que como fonte de carbono tanto dextrose, maltose, D-arabinose e sacarose apresentaram resultados positivos, não interferindo na produção do pigmento, mas a ausência de uma fonte de carbono impediu, de alguma forma, a produção do pigmento. Entretanto, o cultivo em batata apresentou uma produção mais intensa de pigmento do que em aveia, indicando que os nutrientes presentes na aveia talvez estejam indisponíveis para que o fungo possa utilizá-los na produção do pigmento, ou sejam insuficientes. Se faz necessário ensaios com outras fontes de carbono e nitrogênio, inclusive o teste da produção em resíduos de indústrias, como farelo de arroz, cascas de castanha da Amazônia entre outros, para avaliar se estes poderiam ser aproveitados para a produção do pigmento.



Figura 03. Cultivo de *P. purpurogenum* CIAM045 em meio Caldo Batata Dextrosado (direita) e Caldo Batata Dextrosado acrescido de Peptona (2%) (esquerda), mostrando a não produção do pigmento vermelho na presença de peptona, após 5 dias de cultivo.

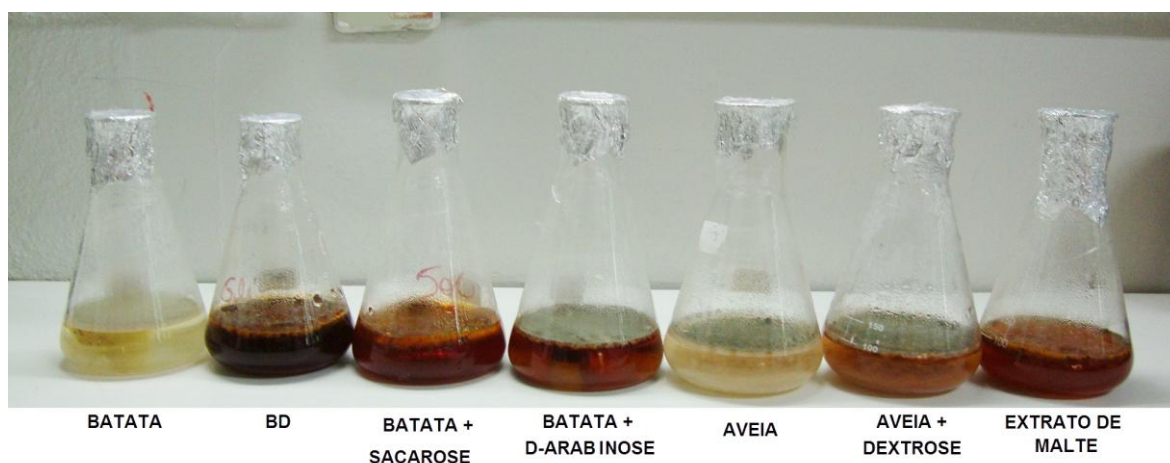


Figura 04. Cultivos líquidos de *P. purpureogenum* CIAM045 em diferentes fontes de carbono. Observando-se que onde houve a produção mais intensa do pigmento vermelho foi em Caldo Batata Dextrosado (BD).

5.2.3 Ensaio de estabilidade

Os extratos brutos contendo os pigmentos (*P. purpureogenum* CIAM042, CIAM045, CIAM2001) foram submetidos a ensaios de estabilidade de pH, temperatura, condições extremas e luminosidade. Os extratos brutos obtidos possuíam um pigmento vermelho que demonstrou alta estabilidade, tanto nos ensaios de mudanças de pH (na faixa de 2,0 a 14,0) como nos ensaios de mudança de temperatura (na faixa de 40 a 100 °C) não houve mudanças de cor ou intensidade da cor. Os extratos foram mantidos por duas horas sob a luz solar e novamente não houve alterações. Os extratos também foram ensaiados em condições extremas, como congelamento (-20 °C), fervura em forno de micro-ondas e desidratação por liofilização, permanecendo constante a coloração e intensidade da mesma.

A estabilidade do pigmento é muito importante principalmente quando este for utilizado em alimentos que precisam ser congelados e depois passar por cozimento, e/ou que apresentam variação no pH durante o processamento ou aquecimento. A estabilidade do pigmento vermelho produzido pelo isolado *P. purpurogenum* CIAM045 demonstra seu potencial para seu uso na indústria de alimentos.

5.2.4 Partição líquido-líquido

Os fracionamentos cromatográficos em coluna aberta (poliamida 6), coluna cromatográfica filtrante (Amberlite e Florisil) e em cartuchos Sep-pak não foram eficientes, ocorrendo retenção do pigmento nas fases estacionárias ou houve a necessidade de utilização de uma grande quantidade de fase móvel (solvente) o que inviabiliza a utilização dessas metodologias para a purificação do pigmento. O fracionamento que apresentou melhores resultados foi o PLL, utilizando a extração das substâncias com os solventes DCM, AcOEt e BuOH (Figura 05). Após este fracionamento tanto o pigmento vermelho (isolados *P. purpurogenum* CIAM042, CIAM045 e AIAM2001) como o pigmento marrom (*Fusarium sp.* AIAM006) foram extraídos na fase butanólica. O volume de solvente utilizado variou conforme o volume do extrato submetido à partição, utilizando a proporção v:v. Para as primeiras partições utilizou-se um volume de 250 mL de cada extrato bruto obtido. Este procedimento permitiu uma separação preliminar dos constituintes químicos para facilitar o seu posterior fracionamento cromatográfico. Após a secagem das amostras estas foram submetidas à cromatografia em camada delgada.



Figura 05. Partição Líquido-Líquido do extrato bruto de *P. purpurogenum* CIAM 045 mostrando a fase BuOH superior (vermelho) e a fase aquosa inferior (creme).

5.2.5. Análise cromatográfica em camada delgada dos extratos

As frações obtidas pela partição líquido-líquido foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), dissolvendo as amostras em DCM:AcOEt (1:1, v/v). Como fase móvel, para eluição das amostras, foram testados os seguintes sistemas: DCM/AcOEt v:v (8:2; 2:8; 1:1), MeOH P.A. (100%), AcOEt/MeOH (8:2), MeOH/AcOEt (9:1), AcOEt P.A. (100%), BAW (BuOH:AcOEt:H₂O – 4:1:2), BEW (BuOH:EtOH:H₂O – 4:1:2,2), CHCl₃ (CHCl₃:MeOH:H₂O – 7:3,5:0,5). Os sistemas de eluição que se mostraram mais eficientes foram DCM/AcOEt (8:2) para as frações DCM e ACOEt (Figura 06), AcOEt/MeOH (8:2) e BEW para as frações butanólicas (Figura 10 e 12) e MeOH/AcOEt (9:1) para as amostras de extrato bruto exudado das colônias (Figura 09). As cromatoplas foram reveladas por métodos físicos com luz UV

254 nm, UV 365 nm e por métodos químicos com anisaldeído sulfúrico (Figuras 06, 07, 09, 10, 11, 12), cloreto férrico, sulfeto férrico e DPPH (Figura 08).

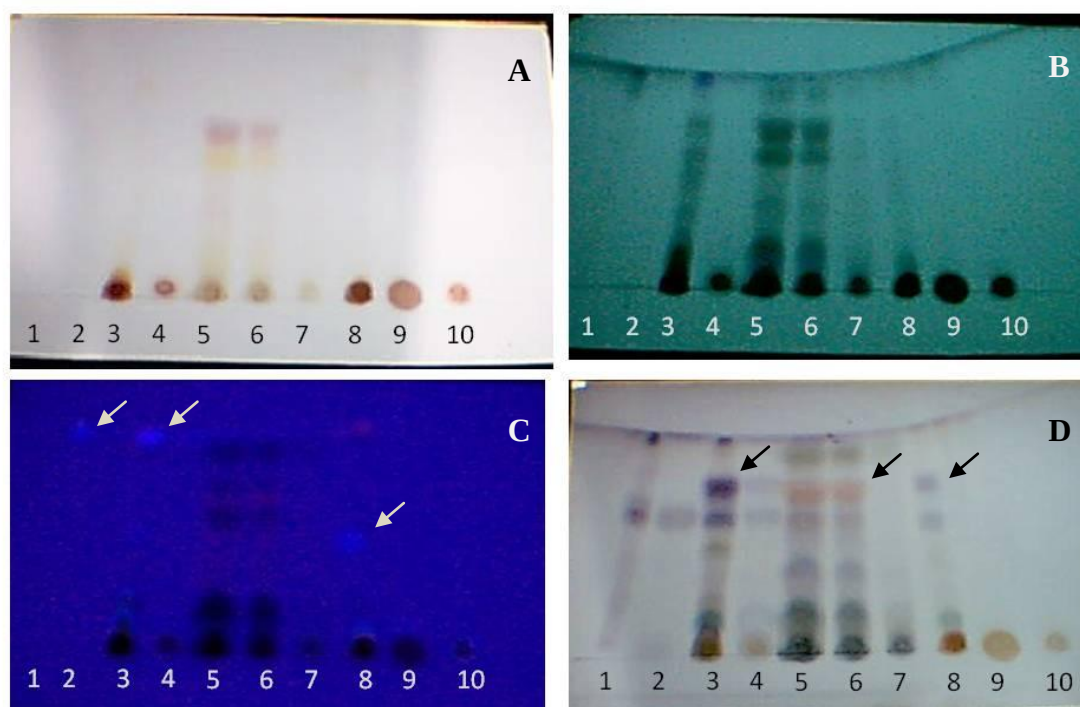


Figura 06. Cromatoplaça: **A** – luz visível, **B** – UV 254 nm, **C** – UV 365 nm, **D** – Revelação com Anisaldeído. Amostras: **1**- Fração DCM CIEAM2001, **2**- Fração AcOEt CIEAM2001, **3**- Fração DCM CIAM045, **4** -Fração DCM emulsão CIAM045, **5**- Fração DCM AIAM006, **6**- Fração DCM emulsão AIAM006, **7** -Fração AcOEt AIAM006, **8** - Fração DCM CIAM042, **9**- Fração DCM emulsão CIAM042 e **10**- Fração AcOEt CIAM042.

Pela cromatografia em camada delgada comparativa observou-se que, os pigmentos vermelho e marrom ficaram retidos nas frações butanólicas da partição líquido-líquido. Na cromatoplaça das frações DCM e AcOEt (Figura 06 –D) visualizou-se a presença de manchas arroxeadas e rosadas quando as placas foram reveladas com anisaldeído, indicando a presença de terpenos e esteróis nas frações DCM e AcOEt dos extratos exceto do extrato de *P. purpureogenum* CIAM042. Já na visualização desta cromatoplaça em UV 356 observa-se a presença de manchas com fluorescência de cor azul (frações DCM dos extratos

de *P. purpureogenum* CIEAM 2001, CIAM045 e CIAM042) o que é um indicativo da presença de alcalóides nestas frações (Figura 06 – C).

Observou-se, na cromatoplaça das frações butanólicas (Figura 07), eluída com MeOH (100%), que estas ficaram retidas na origem ou não foram totalmente separadas com esse sistema de eluição. Tanto a revelação física com UV como a química com anisaldeído demonstram a ineficiência da eluição. Apenas na fração BuOH *P. purpureogenum* CIAM045 emulsão (amostra 2 na Figura 07) aparece uma mancha de coloração avermelhada na luz visível (Figura 07 –A) e a mesma mancha apresenta-se de cor marrom na UV 254 nm (Figura 07 – B), o que pode ser um indicativo da presença de derivados antraquinônicos.

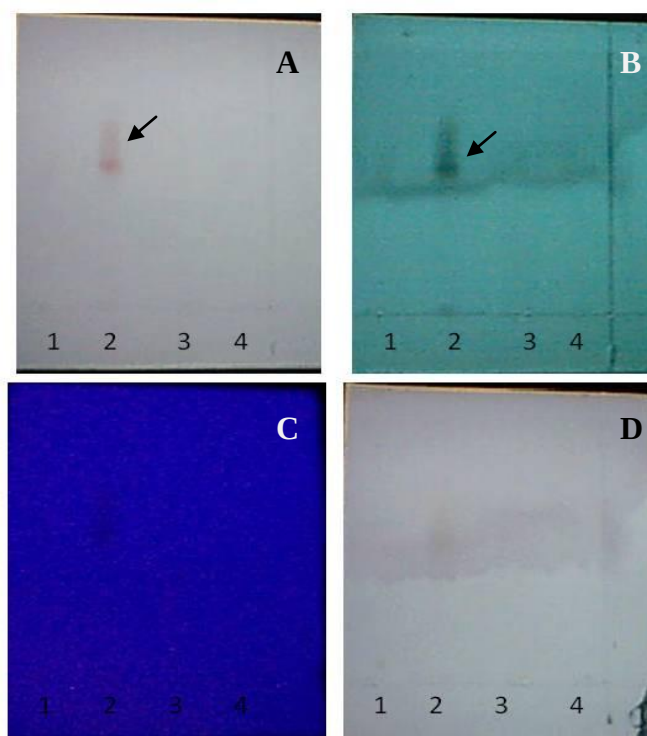


Figura 07. Cromatoplaça: **A** – luz visível, **B** – UV 254 nm, **C** – UV 365 nm, **D** – Revelação com Anisaldeído. Amostras: **1**- Fração BuOH CIAM045, **2**- Fração BuOH emulsão CIAM045, **3**- Fração BuOH AIAM006 **4** –Fração BuOH CIAM 042.

Quando as frações butanólicas foram eluídas com AcOEt/MeOH (8:2) observou-se que a separação das substâncias não foi completa mas observam-se as manchas avermelhadas na luz visível (Figura 08 – A) e as mesmas se apresentam de cor marrom quando reveladas em UV 254nm (Figura 08 - B), indicativo de que nessas frações podemos encontrar derivados antraquinônicos. Também observou-se na revelação com DPPH (Figura 08 – D) a presença de uma mancha amarela na amostra 3 (fração BuOH de *Fusarium sp.* AIAM006), que é um indicativo da presença de substâncias antioxidantes nesta fração.

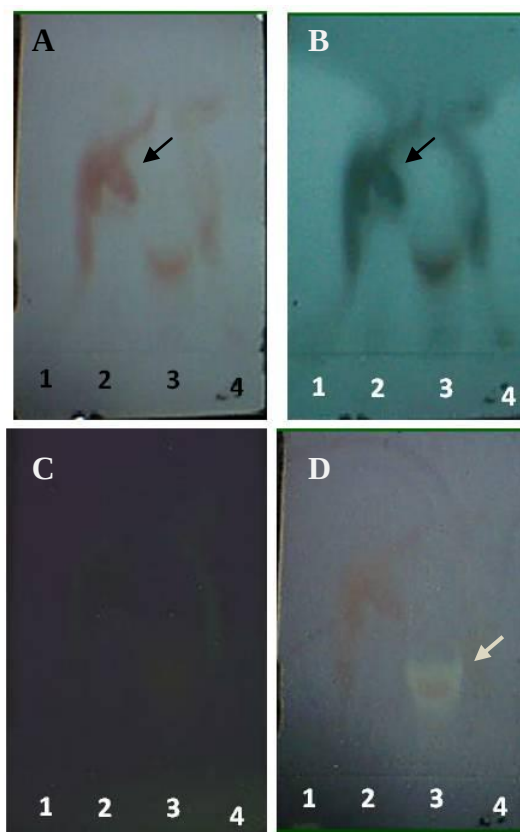


Figura 08. Cromatoplaça: **A** – luz visível, **B** – UV 254 nm, **C** – UV 365 nm, **D** – Revelação com DPPH. Amostras: - Fração BuOH CIAM045, **2**- Fração BuOH emulsão CIAM045, **3**- Fração BuOH AIAM006 **4** – Fração BuOH CIAM 042.

Os isolados *P. purpurogenum* CIAM045 e *P. purpurogenum* CIAM42 quando cultivados tanto em meio líquido como sólido exudavam o pigmento vermelho na superfície das colônias (visível na Figura 01 – D). Este exudado foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro esterelizado, e então filtrado em membrana de éster-celulose (0,22 µm – TPP Spritzen- Syringe-Filter) para a remoção dos conídios. O pigmento obtido (extrato puro) foi submetido a análise cromatográfica em camada delgada. A cromatoplaça foi eluída com o sistema AcOEt/MeOH (8:2). As revelações em UV 254 e 365 nm (Figura 09 –B e C) mostraram a presença de manchas azuladas e marrons em UV 254nm, indicando a presença de derivados antraquinônicos e de algumas manchas verdes em UV 365 nm (próximas à origem) indicativo da presença de cumarinas. Na revelação com anisaldeído observou-se a presença de manchas de coloração azul, estas seriam um indicativo da presença de lignanas. A produção de lignanas no metabolismo secundário de fungos já foi descrita na literatura, inclusive para espécies de *Penicillium sp* (RODRIGUES FILHO, 2010), o mesmo gênero dos isolados que foram alvos do presente estudo.

Uma vez que se observou que os pigmentos ficaram retidos nas frações butanólicas, realizou-se um ensaio cromatográfico para comparar o pigmento vermelho (*P. purpurogenum* CIAM042, *P. purpurogenum* CIAM045 e *P. purpurogenum* CIEAM2001) com o mesmo meio de cultura (BD) onde os isolados foram cultivados para a obtenção dos pigmentos, averiguando, assim, se nas frações butanólicas também houve a retenção de substâncias que pertenciam originalmente ao meio de cultivo (Figura 10). Para a eluição das substâncias foi utilizado como fase móvel AcOEt/MeOH (8:2) e a revelação química procedeu-se

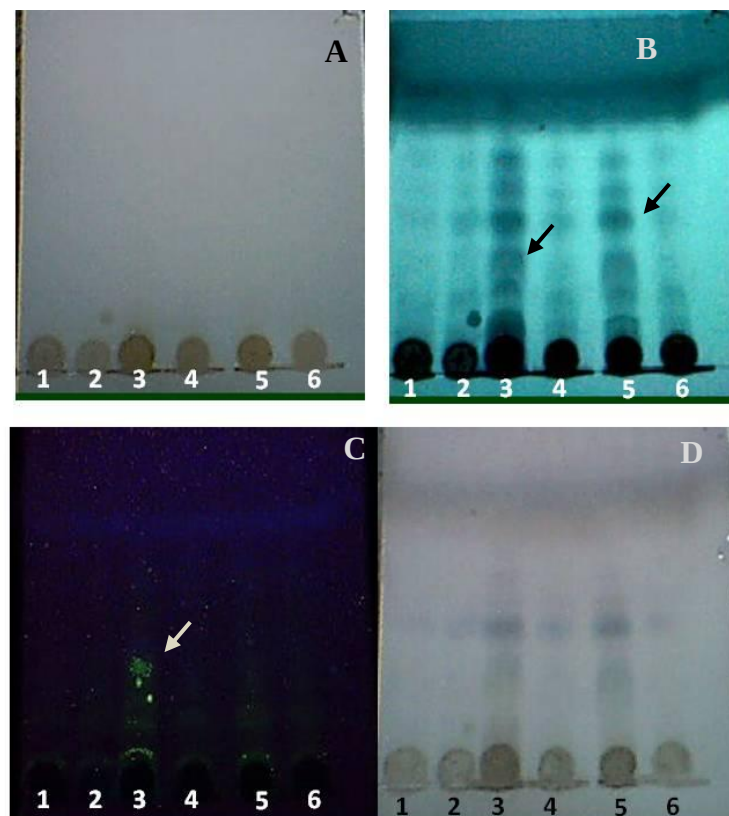


Figura 09. Cromatoplaça: **A** – luz visível, **B** – UV 254 nm, **C** – UV 365 nm, **D** – Revelação com Anisaldeído. Amostras de extratos obtidos de exudado da colônia fúngica: **1, 2 e 3** - CIAM045, **4, 5 e 6** – CIAM042.

com anisaldeído (Figura 10 – D). Nesta cromatoplaça observa-se que as substâncias obtidas nas frações butanólicas não se encontram na amostra do meio de cultura. Além disso na revelação em UV 365 observou-se manchas de fluorescência amarela (*P. purpurogenum* CIEAM2001 e *P. purpurogenum* CIAM042) e uma mancha vermelha (*P. purpurogenum* CIAM 045), estas seriam indicativos da presença de derivados antraquinônicos na composição dos pigmentos vermelhos produzidos por estes isolados.

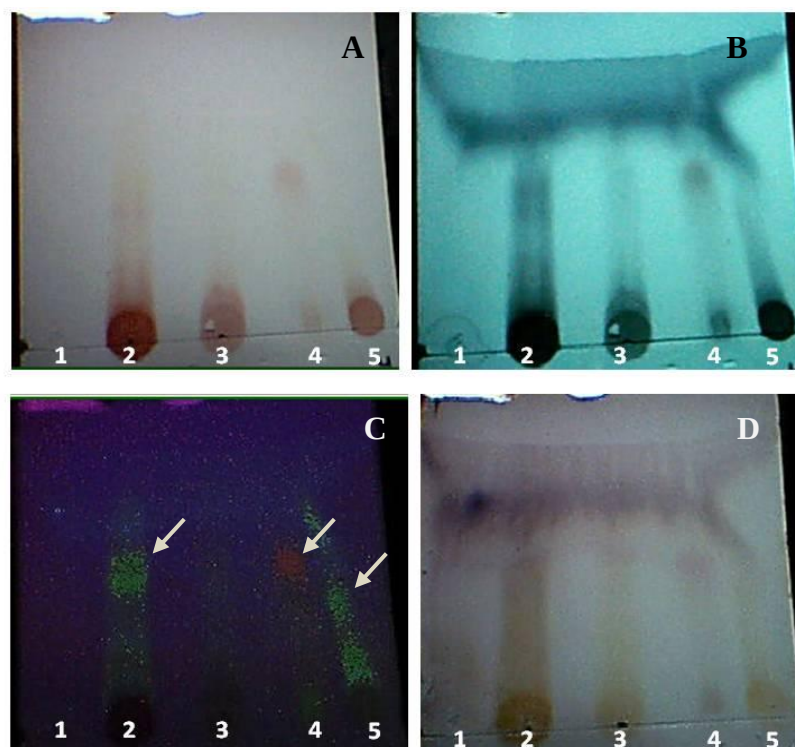


Figura 10. Cromatoplate: **A** – luz visível, **B** – UV 254 nm, **C** – UV 365 nm, **D** – Revelação com Anisaldeído. Amostras: **1**- Meio BD, **2**- Fração BuOH CIEAM2001, **3**- Fração BuOH CIAM045, **4** - Fração BuOH emulsão CIAM045, **5**- Fração BuOH CIAM042.

Devido à má separação das substâncias contidas nas frações butanólicas utilizando-se os sistemas de eluição mais comuns, novos testes de eluição foram realizados. Nestes testes utilizou-se como eluentes o sistema BAW (Figura 11) em o sistema BEW (Figura 12). Observou-se que pelo sistema BEW houve uma melhor separação das substâncias em comparação com o sistema BAW, apesar de este ser mais eficiente em carregar as substâncias quando comparado com o sistema de eluição AcOEt/MeOH (8:2).

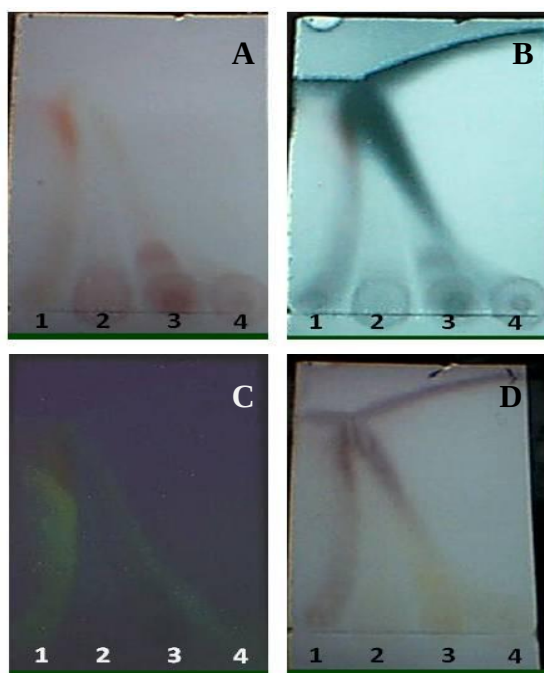


Figura 11. Cromatoplaça: **A** – luz visível, **B** – UV 254 nm, **C** – UV 365 nm, **D** – Revelação com Anisaldeído. Amostras: **1** - Fração BuOH AIAM006, **2**- Fração BuOH CIAM045, **3**- Fração BuOH emulsão CIAM045 **4** -Fração BuOH CIAM 042. emulsão CIAM045, BAW

Na revelação da cromatoplaça eluída com o sistema BEW podemos visualizar uma separação das substâncias já na observação a luz visível. Na visualização em UV 254 nm observam-se manchas marrons nas frações butanólicas de *P. purpureogenum* CIAM045 e *P. purpureogenum* CIAM042 (Figura 12 – B). Já na visualização com luz UV 365 nm, podemos observar o aparecimento de manchas fluorescentes avermelhadas, na fração de AIAM006 (pigmento marrom) e esverdeada, na fração de *P. purpureogenum* CIAM042 (Figura 12 – C). O aparecimento de fluorescência vermelha em luz UV 365 nm indicam a presença de derivados antraquinônicos e manchas fluorescentes de cor verde indica a presença de cumarinas. Enquanto que na revelação química com

anisaldeído pode-se observar manchas arroxeadas nas frações de *Fusarium sp.* AIAM006 e *P. purpurogenum* CIAM042, indicando a presença de terpenos e esteróides (Figura 12 – D).

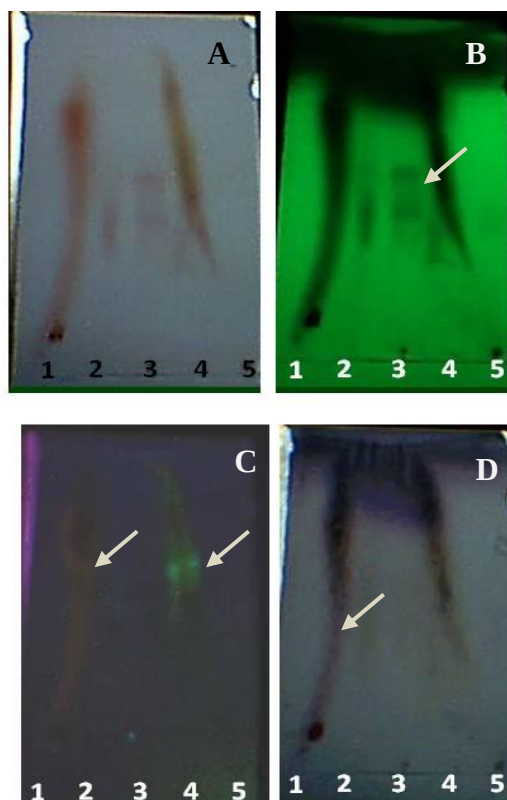


Figura 12. Cromatoplate: **A** – luz visível, **B** – UV 254 nm, **C** – UV 365 nm, **D** – Revelação com Anisaldeído. Amostras: **1** - Fração BuOH AIAM006, **2**- Fração BuOH CIAM045, **3**- Fração BuOH emulsão CIAM045 **4** –Fração BuOH CIAM 042, **5** – Fração DCM emulsão CIAM045.

5.2.6. Análises e purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Dando continuidade à purificação dos pigmentos produzidos pelos isolados selecionados, foram realizadas análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE, com detector U.V. (Shimadzu). As frações obtidas pelas partições e o extrato puro exudado do isolado CIAM045 foram analisadas, sendo que todas as amostras foram dissolvidas em MeOH:H₂O (8:2). As fases móveis testadas, volume de injeção/min, tempo de corrida e gradientes testados estão listados na Tabela 05.

As fases móveis utilizadas foram gradiente de MeOH:H₂O e ACN:H₂O sendo que o gradiente MeOH:H₂O demonstrou melhor resolução nas análises e na purificação em CLAE do pigmento vermelho obtido na fração butanólica da partição líquido-líquido. A fração BuOH foi a que apresentou melhor resolução e menor tempo de corrida (7 min) em CLAE, com gradiente de eluição de MeOH:H₂O (Figura 13). A análise do extrato exudado do cultivo de *P. purpureogenum* CIAM045 (Figura 14) mostrou a presença de muitas substâncias que não puderam ser bem resolvidas nas análises realizadas, o que impossibilitou a separação das substâncias para realizar a purificação do pigmento vermelho diretamente a partir do exudado. Tanto a fração BuOH do exudado como o extrato puro pigmentado quando submetidos às análises em CLAE não apresentaram boa resolução (cromatogramas não apresentados).

Tabela 05. Amostras submetidas à análise em CLAE e condições da corrida: fase móvel, volume de injeção, tempo e gradiente de eluição.

Amostra	Fase Móvel	Vol. de injeção	Tempo/Gradiente
Extrato puro exudado	MeOH	1 µL	- Isocrático : 40min/75% - 0,01min/30%, 15min/70%, 20min/70%, 25min/100%, 30min/100%, 40min/30%
	ACN	2 µL	- 0,01min/100%, 40min/100% - 0,01min/15%, 20min/100%, 30min/100%, 35min/15%
Fração BuOH do exudado	ACN	2 µL	- 0,01min/40%, 10min/100%, 30min/100%, 40min/40%
	ACN/H ₂ O acidificada 2%	2 µL	- 0,01min/95%, 40min/95% - 0,01min/40%, 10min/100%, 30min/100%, 40min/40%
Extrato puro do cultivo	MeOH	1 µL	- 0,01min/30%, 15min/70%, 20min/70%, 25min/100%, 30min/100%, 40min/30%
	ACN	2 µL	- 0,01min/15%, 20min/100%, 30min/100%, 35min/15%
Fração BuOH do cultivo	MeOH	1 µL	- 0,01min/30%, 40min/30% - 0,01min/30%, 20min/100%, 30min/100%, 40min/30% - 0,01min/40%, 40min/40% - 0,01min/50%, 40min/50%
	MeOH	2 µL	- 0,01min/50%, 20min/100%, 25min/100%, 30min/50%
	MeOH	30 µL	- 0,01min/50%, 30min/50% - 0,01min/50%, 10min/50%, 15min/100%, 20min/50%
	MeOH	40 µL	- 0,01min/50%, 30min/50%
	MeOH	45 µL	- 0,01min/30%, 40min/30% - 0,01min/20%, 10min/30%, 30min/30%

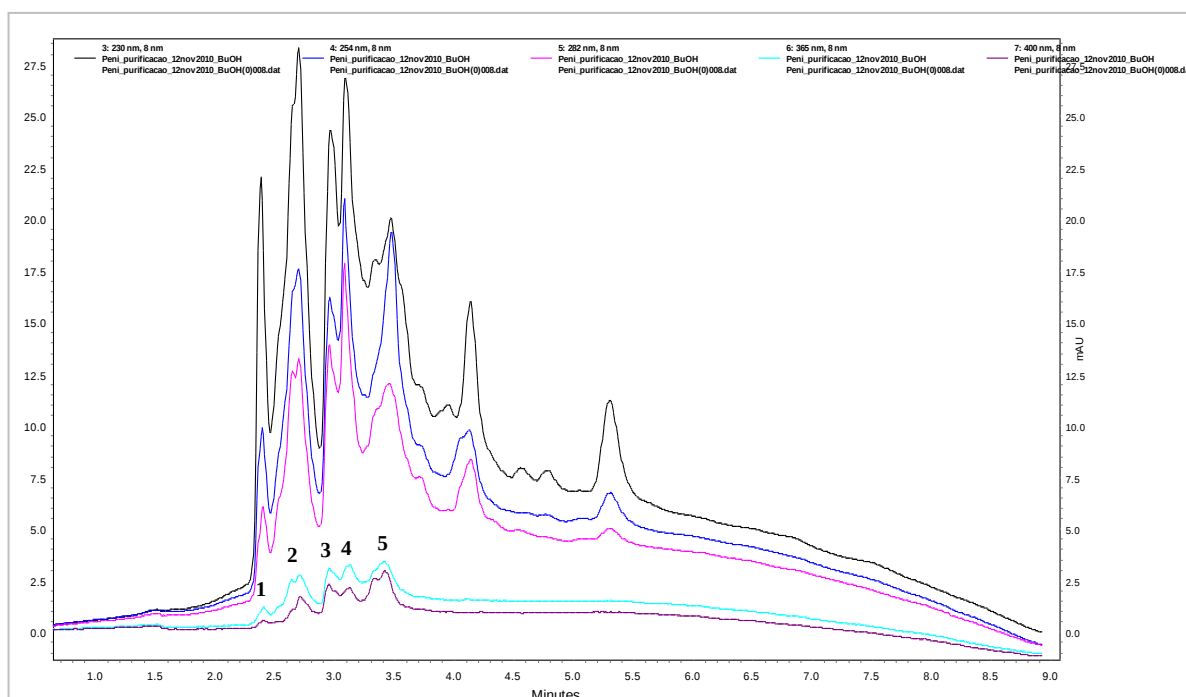


Figura 13. Cromatograma da purificação em CLAE da fração butanólica obtida na PLL do extrato do isolado *P. purpurogenum* CIAM045. Fase móvel em gradiente de MeOH:H₂O, vol. de injeção de 30μL, coluna Phenomenex C18.

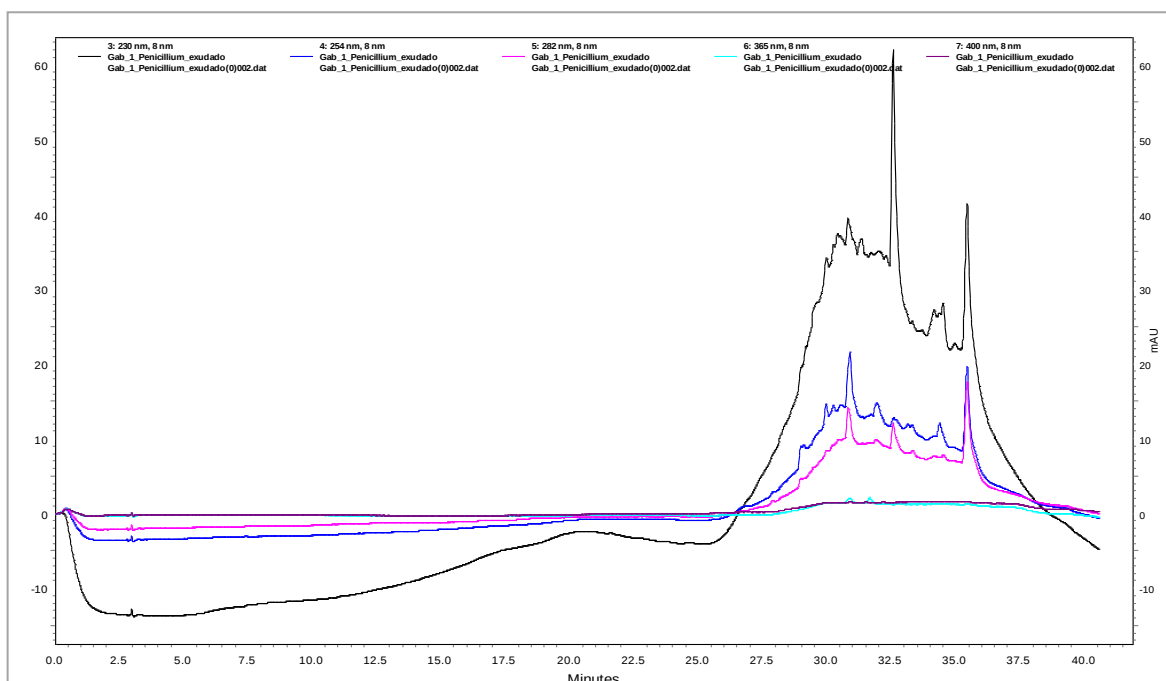


Figura 14. Cromatograma de análise em CLAE do extrato puro exudado do cultivo do isolado *P. purpurogenum* CIAM045. Fase móvel em gradiente de MeOH:H₂O, vol. de injeção de 1μL, coluna Phenomenex C18.

As análises da fração BuOH (*P. purpurogenum* CIAM045) mostraram a presença de cinco substâncias majoritárias. Em absorvância de 254 nm (Figura 13), as cinco substâncias apresentaram os seguintes tempos de retenção (Tr): **gfz 1** – 2,4 min; **gfz 2** – 2,7 min; **gfz 3** – 3,0 min; **gfz 4** – 3,1 min; **gfz 5** – 3,5 min. Estas mesmas substâncias, obtiveram os seguintes Tr em absorvância de 365 nm e 400nm: **gfz 1** – 2,4 min; **gfz 2** – 2,7 min; **gfz 3** – 2,95 min; **gfz 4** – 3,1 min; **gfz 5** – 3,4 min. Essas frações foram coletadas e submetidas à análise em RMN. Ao total, foram coletadas nove frações correspondentes aos picos observados nos cromatogramas, mas observou-se que as substâncias que apresentaram pigmentação após purificação foram apenas as cinco primeiras, o que corresponde com o resultado observado no cromatograma (Figura 13). Estas substâncias foram as únicas que foram detectadas nos maiores comprimentos de onda (365 e 400nm), indicando que as substâncias cromóforas ou que possuem coloração estariam entre estas cinco.

5.2.7. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As cinco primeiras substâncias (**gfz 1**, **gfz 2**, **gfz 3**, **gfz 4**, **gfz 5**) obtidas na purificação por CLAE foram submetidas às análises em RMN. As análises ainda não estão concluídas, sendo que foram obtidos os espectros das substâncias **gfz 2**, **gfz 4** e **gfz 5** e os resultados foram parcialmente concluídos.

Determinação estrutural de gfz.02

A substância codificada como **gfz 2**, isolada a partir da fração butanólica do extrato do pigmentado secretado pelo isolado *P. purpurogenum* CIAM045 apresentou-se sob a forma de pó amorfo cor-de-rosa, obtendo a massa 2,7 mg. A proposta estrutural para **gfz.02** ainda não foi concluída, sendo analisado até o presente momento o espectro de ^1H desta amostra (Figura 15). O espectro de RMN ^1H para **gfz.02** apresentou sinais com deslocamento na região de anéis aromáticos. Para a faixa entre 6,99 e 7,35 ppm do espectro de RMN ^1H , correspondente à região aromática, possivelmente com várias substituições. O singlete em 7,20 ppm indica que este hidrogênio não está acoplando com nenhum hidrogênio nas posições orto e meta. Os deslocamentos químicos de ^1H estão na Tabela 06.

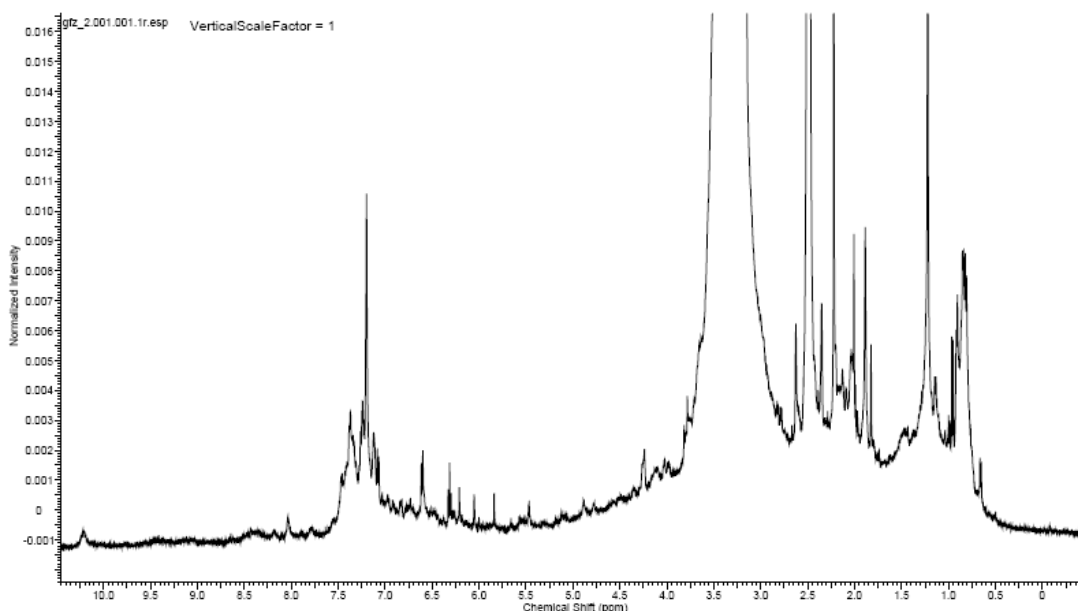


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de gfz.2, DMSO-d₆

Tabela 06. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H , da fração gfz.2 obtida por purificação em CLAE da fração BuOH do pigmento CIAM045, em DMSO- d_6 , TMS, 500MHz.

$^{13}\text{C} \times ^1\text{H} - \delta$ em ppm e multiplicidade
2,63 (1H, s)
2,35(1H, s)
2,22 (1H, s)
2,01 (1H, s)
1,89 (1H, s)
1,83 (1H, s)
1,22 (1H, s)
0,96 d
0,82 m
0,67 (1H, s)
6,61 d
6,31 t
6,21 (1H, s)
6,05 (1H, s)
5,54 (1H, s)
7,37d
7,28 (1H, s)
7,24 m
7,20 (1H, s)
7,12 (1H, s)
7,08 d

Estes sinais na região de anéis aromáticos (7,0 – 7,5 ppm) indicam a possibilidade do pigmento ser resultado da presença de duplas ligações conjugadas, as quais são mais facilmente excitáveis em comprimentos de onda menos energéticos, como o comprimento 400 nm, observado pela absorção da substância durante a purificação por CLAE.

Determinação estrutural de gfz.04

A amostra codificada como **gfz.04**, também foi isolada a partir da fração butanólica do extrato do pigmentado produzido pelo isolado *P. purpureogenum* CIAM045. A coloração mostrou-se cor-de-rosa, durante o processo de purificação e também após a evaporação dos solventes, com massa de 7,0 mg.

As análises de RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135, HMQC e HMBC mostraram que a substância isolada trata-se de um dissacarídeo. Porém, a absorção no comprimento de onda de 400 nm, observados durante a purificação, sugerem que o dissacarídeo não é a única substância desta amostra, tendo a outra substância uma estrutura molecular possuindo ligações duplas, ou par de elétrons não-ligantes para ocorrer esta absorção. Quando analisado o espectro de ^1H na região de campo mais baixo, como 6,9 a 7,4 ppm, observamos sinais de baixa intensidade, apresentando-se como sinais de uma outra substância presente na amostra, mas em quantidade bem menor que o dissacarídeo.

Os sinais em δ 6,2 e 6,58 ppm possivelmente são referentes às hidroxilas presentes na estrutura do dissacarídeo, que podem aparecer no espectro. Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C estão descritos na Tabela 07.

Os espectro de RMN de ^1H de **gfz.4** (Figura 15) apresenta sinais intensos com valores de deslocamentos químicos de 2,8 ppm até 3,9 ppm, região dos sinais dos hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos, característicos de açúcares em 2,87 ppm.

O tripleto observado em 2,87 ppm refere-se ao acoplamento de dois hidrogênios acoplando em posição axial – axial, de anéis do tipo pirano. Ainda, o espectro de RMN ^1H apresentou um dubleto em δ 4,87 (J= 10 Hz) o qual foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" do açúcar em posição β . Os multipletos na região de δ 2,8, a δ 3,9 foram atribuídos aos hidrogênios metínicos e metilênicos da porção glicosídica, com base na comparação com dados da literatura.

Tabela 07. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , da fração **gfz.4** obtida por purificação em CLAE da fração BuOH do pigmento *P. purpureogenum* CIAM045, em DMSO- d_6 , TMS, 500MHz.

$^{13}\text{C} \times ^1\text{H} - \delta$ em ppm e multiplicidade	
^{13}C	^1H
62,24	2,49(1H, s)
71,30	2,87 (1H, t, $J = 20$ Hz)
71,62	2,98(1H, s)
73,26	3,02 (1H, m, $J = 20$ Hz)
73,97	3,09 (1H, t, $J = 20$ Hz)
75,72	3,55 (1H, m, $J = 35$ Hz)
77,61	3,64 (1H, d, $J = 15$ Hz)
77,65	4,25 (1H, d, $J = 10$ Hz)
93,10	4,37(1H, s)
97,77	4,48(1H, s)
	4,87 (1H, d, $J = 20$ Hz)
	6,20 (1H, s)
	6,58(1H, s)

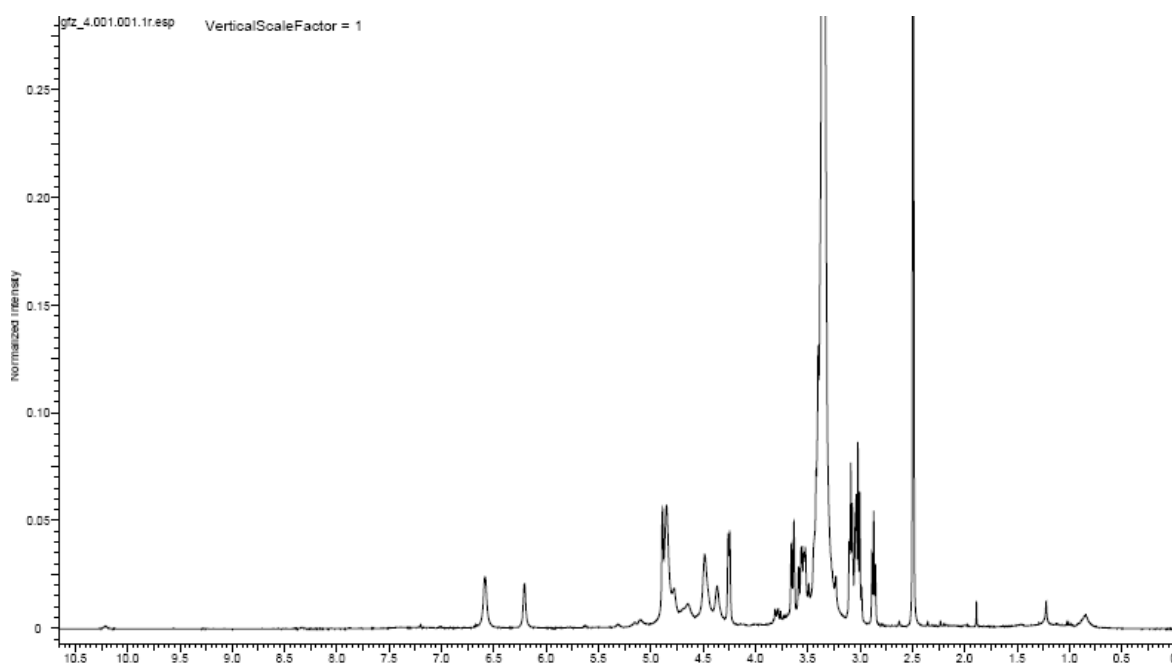


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de **gfz.4**, DMSO- d_6

No espectro de RMN de ^{13}C , observa-se a presença de 11 carbonos, que corroboram com os sinais provenientes de um dissacarídeo (Figura 17). Os sinais entre 97,75 e 93,12 ppm são referentes aos carbonos anoméricos dos açúcares, enquanto que os sinais δ 71, 30, δ 71, 62, δ 73,26, δ 75, 72, δ 77,61, δ 77,65 são característicos dos carbonos metínicos dos açúcares. O sinal em δ 62, 24 ppm, mostrou-se como um CH_2 no espectro de DEPT 135, o que pode ser atribuído ao carbono 6 da hexose presente na amostra.

As correlações do mapa de contorno de HMQC (Figura 18), o qual mostra as relações carbono-hidrogênio a nível de J_1 , apresentou as correlações dos hidrogênios atribuídos como os ligados aos seus anoméricos correspondentes. Assim, o H em δ 4,87 ppm correlaciona-se com o C em δ 92 ppm, e o H em δ 4,48 está relacionado com o C em δ 97 ppm.

A análise conjunta destes espectros, em especial os mapas de contorno do HMQC, permitiram confirmar que os sinais na região de 6 ppm referem-se às hidroxilas dos açúcares, pois não aparecem acoplando em J_1 com nenhum sinal dos carbonos.

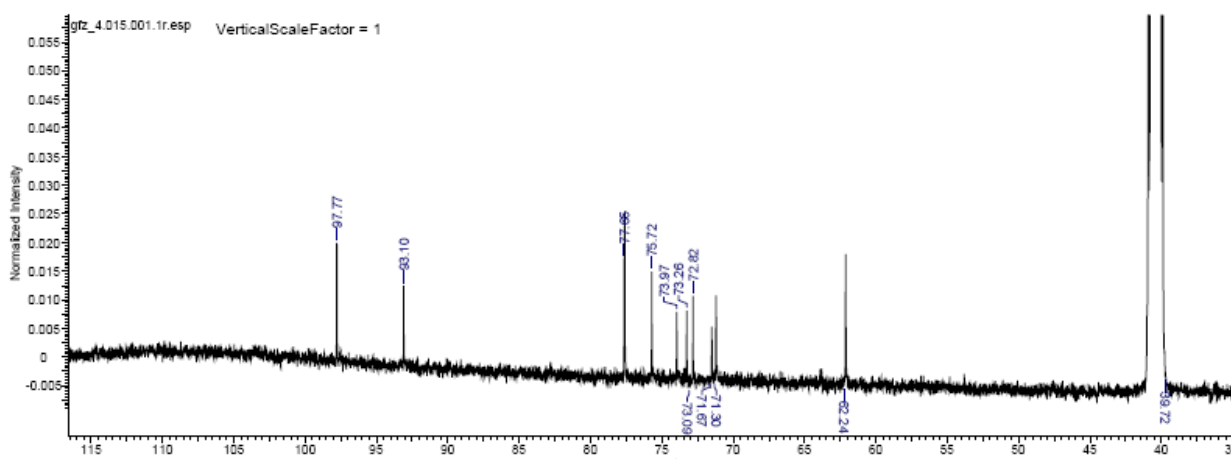


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de **gftz.4**, DMSO- d_6

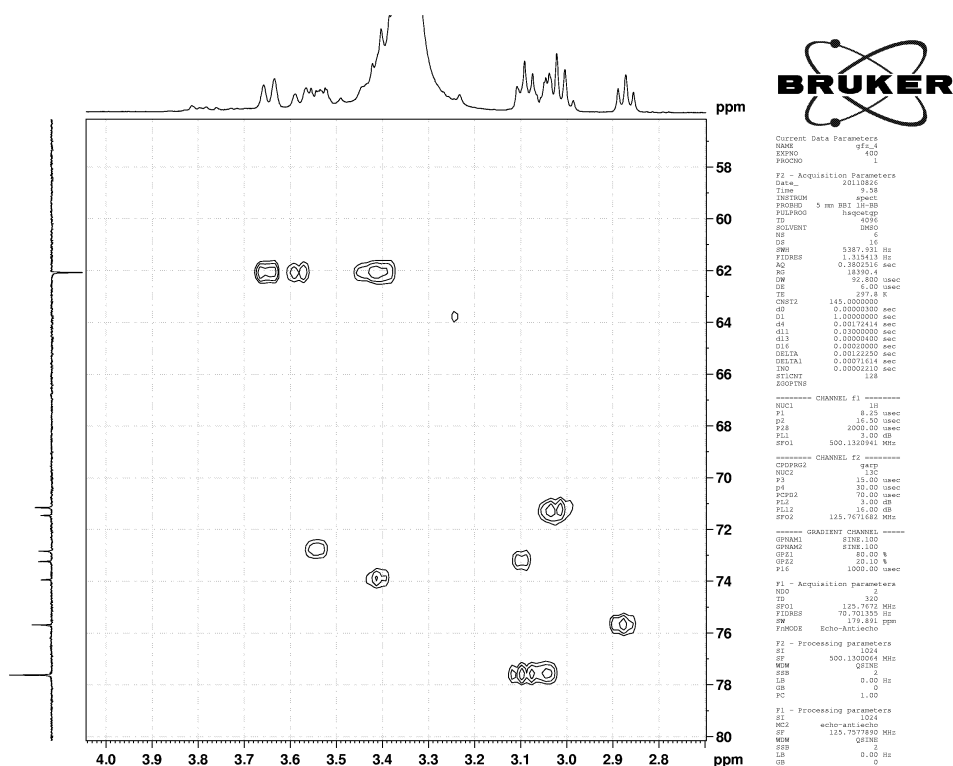


Figura 18 – Mapa de Contorno de HMQC (500/125 MHz) de **gfz.4**, DMSO-*d*₆

Determinação estrutural de **gfz.5**

A amostra rotulada de **gfz.5** foi isolada por CLAE, e corresponde ao pico seguinte a amostra **gfz.4** durante a purificação. A coloração mostrou-se também cor-de-rosa, durante o processo de purificação e também após a evaporação dos solventes, onde obteve-se uma massa de 2,0 mg. O espectro de RMN de ¹H apresentou sinais similares à amostra **gfz.4**, com sinais na região de açúcares, como um tripleto em 2,87 ppm, com J = 10Hz, um multipletto em 3,02 ppm, um multipletto em 3,09 ppm (Figura 19). Multiplettos foram osbservados na região de 3,4 a 3,6 ppm. Apresentou um tripleto em 4,25 ppm, com J = 10 Hz, atribuído ao

hidrogênio ligado ao carbono anoméricos. Esta constante sugere um acoplamento axial-axial, possivelmente com o H em 2,87 ppm, mais protegido.

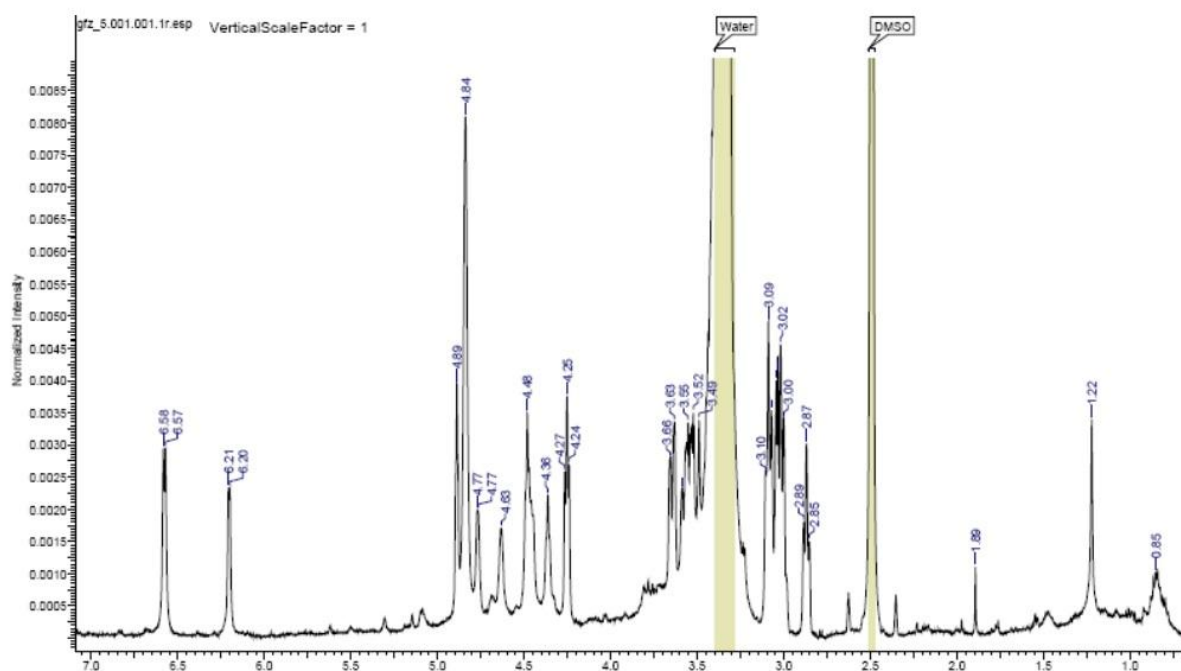


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de **gfz.5**, $\text{DMSO-}d_6$

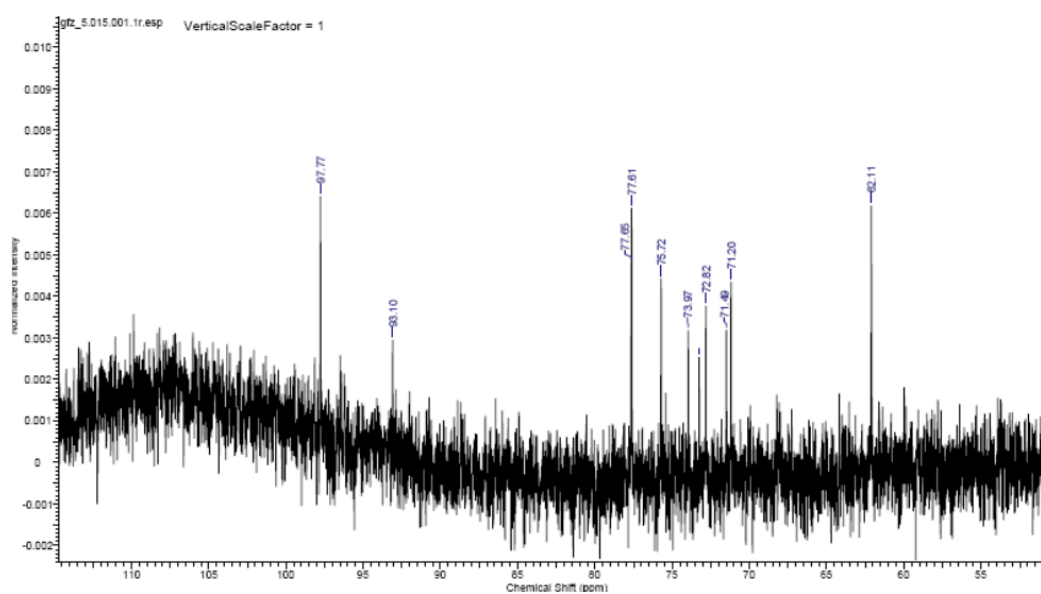


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de **gfz.5**, $\text{DMSO-}d_6$

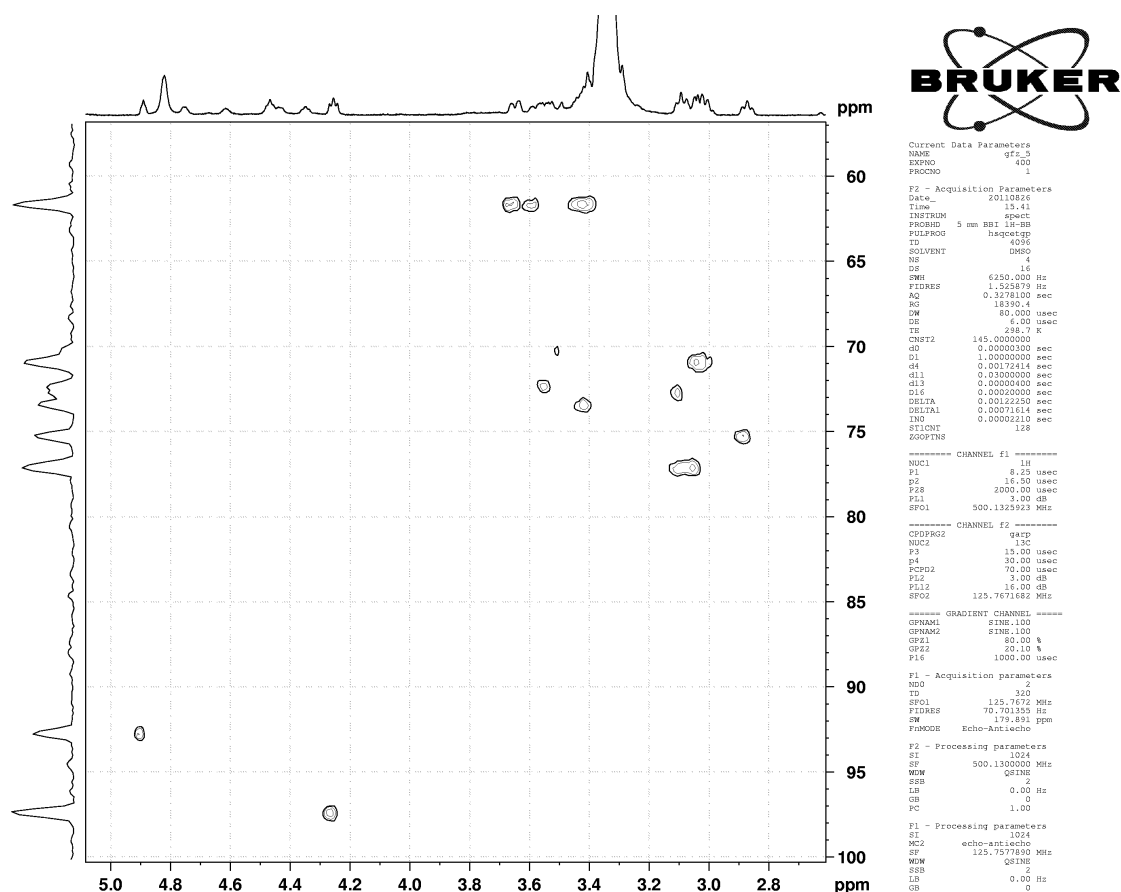


Figura 21 – Mapa de Contorno de HMQC (500/125 MHz) de **gfz.5**, DMSO-*d*6

No espectro de ^{13}C observam-se também 11 sinais, os quais aparecem nas regiões dos carbonos carbinólicos (Figura 20). Aparecem sinais dos carbonos anoméricos e dos carbonos metínicos dos açúcares, na região de 70 pmm. O sinal em 62 ppm aparece como um CH_2 no espectro de DEPT 135. O mapa de contorno de HMQC (Figura 21) corrobora a hipótese do H em 4,25 ppm estar ligado com o carbono anomérico, pois mostra o acoplamento deste com o sinal de ^{13}C em 97,4 ppm, um deslocamento esperado para este carbono do açúcar. Como este está acoplado um hidrogênio mais protegido, sugere-se que

a ligação glicosídica seja do tipo (α - 4) para um dos sacarídeos. Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C estão descritos na Tabela 08.

Tabela 08. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e correlação em HMQC, da fração **gfz.5** obtida por purificação em CLAE da fração BuOH do pigmento *P. purpureogenum* CIAM045, em DMSO- d_6 , TMS, 500MHz.

^{13}C x ^1H – δ em ppm e multiplicidade		
^{13}C		^1H
62,11		3,66 (3H, s)
---		3,63 (1H, s)
---		3,59 (1H, s)
71,20		3,49 (1H, m)
72,82		3,54 (1H, m)
71,49		3,02 (1H, m)
---		3,0 (1H, s)
73,26		3,09 (1H, s)
73,97		3,43 (1H, s)
75,72		2,87 (1H, t, J = 10 Hz)
77,61		3,07 (1H, s)
77,65		3,02 (1H, m)
93,10		4,84 (1H, s)
97,77		4,25 (1H, t, J = 15 Hz)
----		4,36 (1H, s)
----		4,48 (1H, s)
----		4,63 (1H, s)
----		4,77 (1H, s)
----		4,89 (1H, s)
----		6,21 (1H, d, J- 5 Hz)
----		6,58 (1H, d, J- 5 Hz)

5.3 Ensaios Biológicos

5.3.1 Ensaio antioxidante - metodologia empregando o DPPH

Os resultados obtidos nos ensaios quantitativos demonstraram que as fases DCM e AcoEt não apresentaram potencial antioxidante, as análises em

CCDC demonstraram que houve retenção de substâncias, mas não a do pigmento nas fases DCM e AcOEt. Já a fase BuOH apresentou um alto potencial antioxidante tanto para o ensaio com DPPH (equivalência com ácido ascórbico: 1,408). A Tabela 09 mostra o resultado do ensaio antioxidante realizado com as frações da PLL do isolado *P. purpureogenum* CIAM 045, mostrando a equivalência com o ácido ascórbico, expressa em mg (extrato)/mg (ácido ascórbico), o potencial de cada extrato. Quanto menor o valor da equivalência, maior o potencial antioxidante do extrato.

Entre as numerosas atividades biológicas apresentadas pelos metabólitos secundários destaca-se a atividade antioxidante. Estas moléculas atuam como inibidores dos processos de peroxidação e de envelhecimento dos tecidos, assim como também podem agir de modo a complexar o ferro, suprimindo um dos processos catalisadores da oxidação da vitamina C e dos lipídios. A atividade antioxidante observada no ensaio pode estar relacionada com os resultados obtidos em CCDC, quando estes indicaram a presença de antraquinonas e lignanas. A utilização de pigmentos naturais em produtos alimentícios, cosméticos e em processos farmacêuticos tem aumentado nos últimos anos. Um pigmento natural, que além de colorir apresente atividade bioativa, produzido com baixo custo, em pouco tempo, com menor geração de resíduos poluentes é de grande interessante para a indústria.

Tabela 09. Resultado dos ensaios de atividade antioxidante com radical DPPH dos extratos obtidos do cultivo do isolado *P. purpureogenum* CIAM 045.

Extrato	$\Delta\text{Abs} - 517$	[AA]* equivalente	Equivalente
Extrato DCM	$0,016 \pm 0,014$	$0,104 \pm 0,054$	$58,180 \pm 30,184$
Extrato AcOEt	$0,076 \pm 0,01$	$0,337 \pm 0,037$	$-14,959 \pm 1,679$
Extrato BuOH	$0,893 \pm 0,015$	$3,551 \pm 0,059$	$1,408 \pm 0,023$

5.3.2 Ensaios de atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana, pela metodologia de poços em placa, apresentaram resultado negativo para o extrato obtido a partir do isolado *P. purpureogenum* CIAM 045. O extrato foi obtido a partir do cultivo líquido e após 10 dias o cultivo foi filtrado para a separação do micélio. O resultado negativo, demonstrando que o isolado *P. purpureogenum* CIAM 045 não produz nenhuma substância antimicrobiana é um indicativo de que seu extrato é atóxico. Mais ensaios de citotoxicidade se fazem necessários para confirmar a atoxicidade. Este resultado indica o potencial para o uso deste isolado para a produção de pigmentos que possam ser utilizados para consumo humano, tanto como cosméticos como aditivos em alimentos.

5.3.3. Ensaios de toxicidade utilizando *Artemia salina*

Os resultados obtidos para os ensaios com a fração BuOH demonstraram que o extrato não possui atividade tóxica (Tabela 10). O valor máximo aceitável é de 10% de mortalidade como média das três repetições para cada concentração

testada, sendo que obteve-se um percentual de apenas 6,67% de mortes nos ensaios com as concentrações de 500 e 250 µg/mL, o mesmo valor encontrado para o controle com DMSO.



FOTO: SANTOS, V.N.C, 2011.
Figura 22. Béquer contendo larvas de *Artemia salina* com 48 h

Tabela 10. Ensaio de citotoxicidade da fração butanólica do extrato pigmentado de *P. purpureogenum* CIAM045

Contagem de <i>A. salina</i> Vivas (V) e Mortas (M)			
Concentração do extrato	V	M	% de mortalidade média
500 µg/mL	28	2	6,7
250 µg/mL	28	2	6,7
125 µg/mL	30	0	0,0
60 µg/mL	30	0	0,0
30 µg/mL	30	0	0,0
15 µg/mL	30	0	0,0
DMSO	28	2	6,7
Salina	29	1	3,3

Já para o ensaio realizado com o extrato puro exudado, não houve mortalidade em nenhum dos volumes testados, nem mesmo para os controles com salina e DMSO. Esses resultados indicam que tanto o pigmento semi-purificado (fração BuOH) como o extrato puro não possuem substâncias citotóxicas para células de *A. salina*.

Para que um pigmento fúngico possa ser utilizado como colorante de alimentos ou cosméticos faz-se necessário o estudo de sua capacidade tóxica e citotoxicidade. No caso de fungos filamentosos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, que são conhecidos por agregarem as principais espécies produtoras de micotoxinas conhecidas, isso é de extrema importância. A fim de estabelecer a toxicidade de novos produtos naturais, vários ensaios podem ser utilizados, como o ensaio de citotoxicidade com o microcrustáceo *A. salina*, (Silva *et al.*, 2005). Esse ensaio já vem sendo utilizado a décadas para testar a citotoxicidade de metabólitos fungicos, como o ensaio descrito por Harwig e Scott (1971), em que foram avaliados os efeitos de letalidade de várias micotoxinas sob *A. salina*. Neste estudo, observou-se que as principais micotoxinas conhecidas - ocratoxina A, patulina, esterigmatocistina, rubratoxina B, citrinina e ácido penicílico - apresentaram letalidade moderada ou severa aos microcrustáceos.

A falta de atividade citotóxica dos extratos ensaiados no presente estudo, pode sugerir a falta de toxicidade para células de mamíferos, um resultado promissor, levando-se em conta a possibilidade do uso deste pigmento em cosméticos e alimentos.

5.4. Ensaios Moleculares

Alguns isolados produtores de pigmentos foram selecionados para avaliar seu potencial para a produção de micotoxinas por meio da técnica de PCR. Onde estas foram testadas para averiguar a presença de genes responsáveis pela ou que fazem parte da produção de micotoxinas. Buscou-se assim, a identificação molecular da presença de genes relacionados às micotoxinas Ocratoxina, Patulina e Aflatoxina. Segundo Mapari e colaboradores (2009), o perfil para a produção de pigmentos e/ou micotoxinas e a classificação de biossegurança (BSL - BioSafety Level) da espécie fúngica são importantes e devem formar a base para a seleção ou não das espécies para a produção de pigmentos naturais.

Nos ensaios para a presença do gene *otanpks*PN, responsável pela síntese do poliquetídeo de Ocratoxina A, apenas o isolado BEAM2001 (*Penicillium* sp.) apresentou resultado positivo amplificando um fragmento entre 500 à 600bp (Figura 23), como o descrito por Bogs, *et al.*(2006). Para o ensaio de detecção da presença do gene *otanps*PN, responsável pela síntese do peptídeo de Ocratoxina A (Figura 24), os isolados BEAM2001 (*Penicillium* sp), AIAM023 (*Fusarium solani*), BEAM11015 (*Talaromyces ruber*) , AISB023 (*Aspergillus* sp), AIAM034 (*Penicillium glabrum*) e AIAM006 (*Fusarium cf. solani*) apresentaram amplificação positiva. Observa-se aqui que dois isolados, identificados por taxonomia molecular como sendo da espécie *Fusarium solani*, apresentaram resultado positivo, sendo que o isolado AIAM023 apresentou a amplificação de duas bandas, uma delas inespecífica. Bogs, *et al.* (2006) descrevem em seu trabalho que somente as espécies de *Penicillium* testadas apresentaram resultado

positivo para os genes *otanpksPN* e *otanpsPN*, sendo que, as espécies de *Aspergillus* e *Fusarium* apresentaram resultado negativo, o que indicaria que este ensaio seria específico para as espécies de *Penicillium* produtoras de ocratoxina A. Entretanto encontramos resultados diferentes em nosso trabalho, inclusive com uma espécie de *Talaromyces* apresentando resultado positivo, gênero fungico não conhecido pela produção de ocratoxina A.

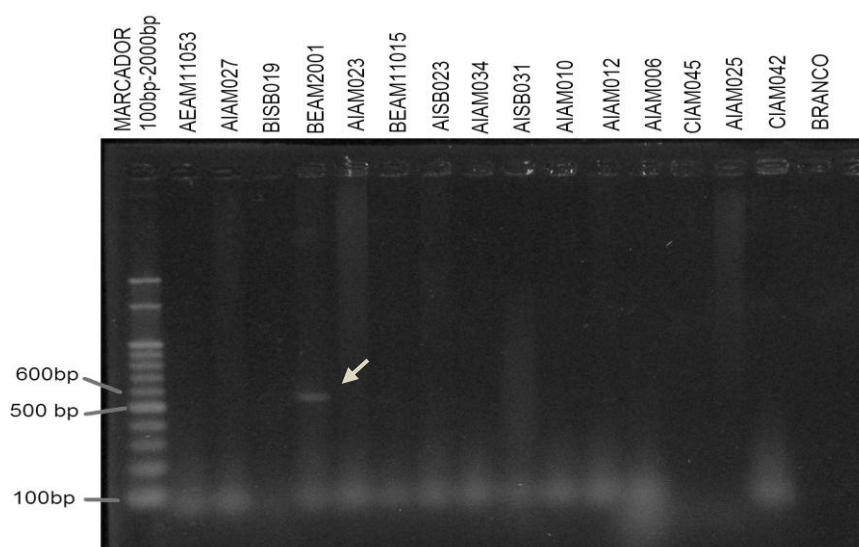


Figura 23. Resultado da PCR para a amplificação do gene *otanpksPN* do polipeptídeo de ocratoxina A, mostrando resultado positivo para o isolado BEAM2001.

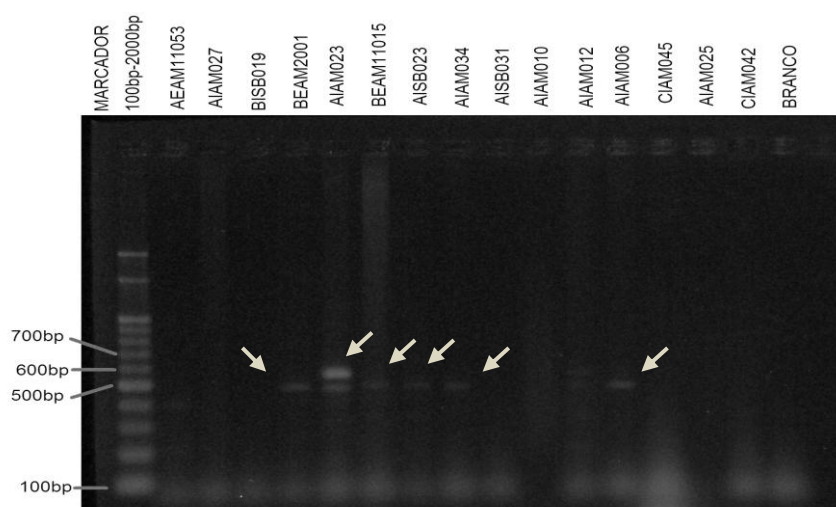


Figura 24. Resultado da PCR para a amplificação do gene *otanpsPN* do peptídeo de ocratoxina A, mostrando resultado positivo para os isolados BEAM2001, AIAM023, BEAM11015, AISB023, AIAM034 e AIAM006.

Ochratoxina A é talvez a mais importante toxina produzida pelo taxon *Penicillium*. Patulin é a segunda mais importante micotoxina do subgênero que possui legislação bem restrita em relação a sua presença principalmente em alimentos a base de frutas para alimentação infantil pela União Europeia (2004). Uma vez que desidrogenase isoeopoxydon (*idh*) é uma importante enzima envolvida fundamentalmente na cadeia metabólica da produção de patulina (PATERSON, *et al.*, 2006), foram realizados ensaios moleculares para a detecção do gene para a enzima em nossos isolados produtores de pigmentos, utilizando os primers *idh*-1 e *idh*-2 (Figura 25). Em nossos ensaios obtivemos resultado positivo para os isolados BEAM2001 (*Penicillium sp*), AIAM023 (*Fusarium solani*), BEAM11015 (*Talaromyces ruber*) e E AISB023 (*Aspergillus sp*). A patulina é uma micotoxina produzida por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, entretanto, em nossos resultados encontramos novamente isolados do gênero *Fusarium* e *Talaromyces* com a presença do gene para a *idh*, devido a intensidade dessas bandas ser fraca e o tamanho ser menor que 600bp, isso poderia indicar anelamento em regiões inespecíficas. Já que o fragmento esperado para essa amplificação é de 600bp, segundo Paterson e colaboradores (2006).

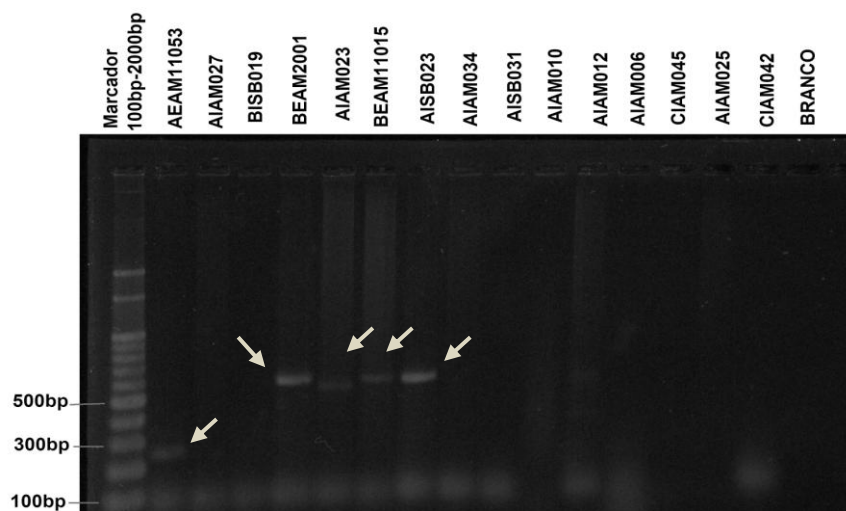


Figura 25. Resultado da PCR para a amplificação do gene *idh*, enzima desidrogenase isoepoxydon, mostrando resultado positivo para os isolados BEAM2001, AIAM023, BEAM11015 e AISB023.

Hodges e colaboradores (1964), relataram a produção de aflatoxina em um isolado de *Penicillium puberulum* Bainer, obtido de amendoim. Os resultados foram confirmados por cromatografia em camada delgada comparando com aflatoxina produzida por *A. flavus*. Geisen (1996) analisou isolados de *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium moliniforme*, *F. solani* para a presença de *nor1*, *ver-1* e *omtA*. As reações foram realizadas com PCR multiplex, com diferentes espécies de fungos que normalmente podem ser encontrados em alimentos. Todas as espécies, exceto uma, deram resultado negativo. A exceção foi o *Penicillium roqueforti* (*nor1* e *ver1*), indicando que este possui sequencias genômicas homologas a esses dois genes de *Aspergillus parasiticus*. *P. roqueforti* é capaz de produzir vários metabólitos secundários da via dos poliquetídeos, como patulina, ácido penicílico e ácido micofenólico (BETINA, 1989).

A rota metabólica parcial proposta para a síntese de aflatoxina (um metabólito secundário de poliquetídeos) é a seguinte: acetato > acida

norsolorínico > averantina > averufanina > averufina > versiconal hemiacetal acetato > versicolorina > esterigmatocistina > O-metilesterigmatocistina > aflatoxina (JAY, 2009). Sendo assim, no presente estudo, os isolados foram ensaiados para a presença dos seguintes genes: *aflR*, gene regulador de aflatoxina; *stcE*, gene para esterigmatocistina; *nor1*, gene para ácido norsolorínico; *ver1*, versicolorina e; *omtA*, gene para O-metilesterigmatocistina. Os resultados obtidos foram positivos para a presença desses genes apenas para o isolado AIAM023 (*Fusarium cf. solani*) (Figuras 26, 27, 28, 29 e 30). Nenhum isolado ensaiado pertencente ao gênero *Aspergillus* ou *Penicillium* apresentou a presença desses genes.

Nesta pesquisa, o resultado de maior relevância é o de que nem o isolado CIAM042 ou o CIAM045, ambos produtores do pigmento vermelho e identificados como *P. purpurogenum*, apresentaram a presença de nenhum dos genes responsáveis pelas micotoxinas ensaiadas. Esses resultados corroboram com os descritos por Paterson, *et al.* (2006) em estudos com a mesma espécie para a presença do gene *idh* e a produção de patulina, onde ambos os resultados foram negativos.

Dentro do gênero *Penicillium*, subgênero *Biverticillium*, que inclui *P. marneffe* (patogênico ao ser humano), encontramos várias outras espécies produtoras de pigmentos vermelhos, inclusive *P. purpurogenum*. Sendo que essas espécies não produzem micotoxinas nem são conhecidas como patogênicas (MAPARI, *et al.*, 2005). *Penicillium purpurogenum* já foi descrito como produtor dos pigmentos purpurogenome (laranja – amarelo) (ROBERTS & WARREN, 1955), mitorubrin (amarelo) e mitorubrinol (laranja a vermelho)

(BUCHI, *et al.*, 1965). Mas nenhum dos pigmentos descritos apresenta solubilidade em água e a estabilidade em diferentes pHs, como o pigmento vermelho produzido pelos isolados CIAM042 e CIAM045 o que as torna potenciais para uso.

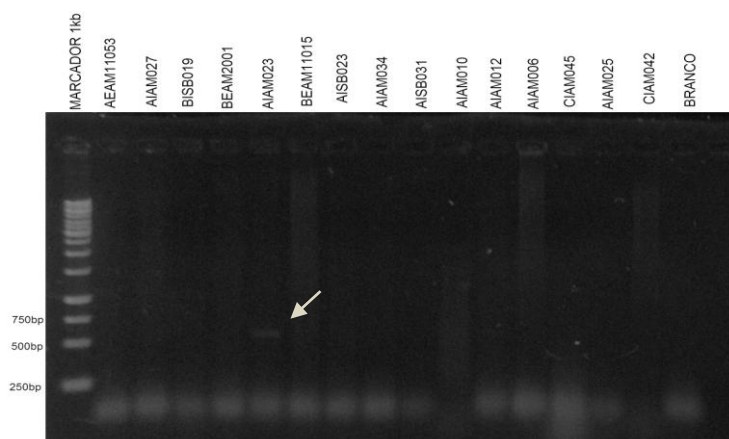


Figura 26. Resultado da PCR para a amplificação do gene *aflR*, gene regulador de aflatoxina, mostrando resultado positivo para o isolado AIAM023.

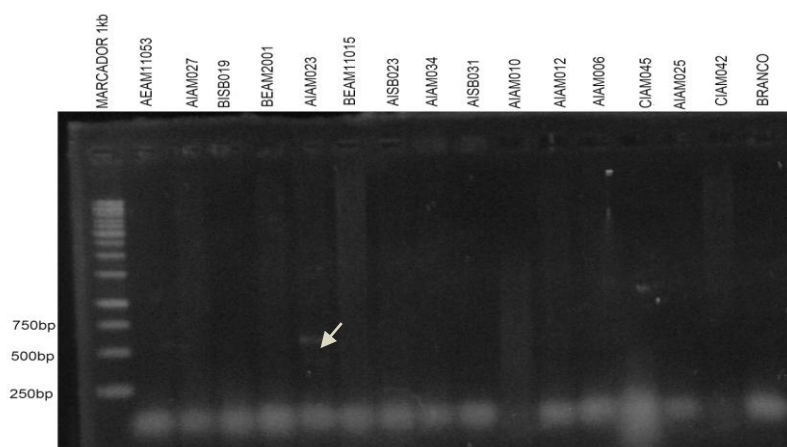


Figura 27. Resultado da PCR para a amplificação do gene *stcE*, gene de esterigmatocistina, mostrando resultado positivo para o isolado AIAM023.

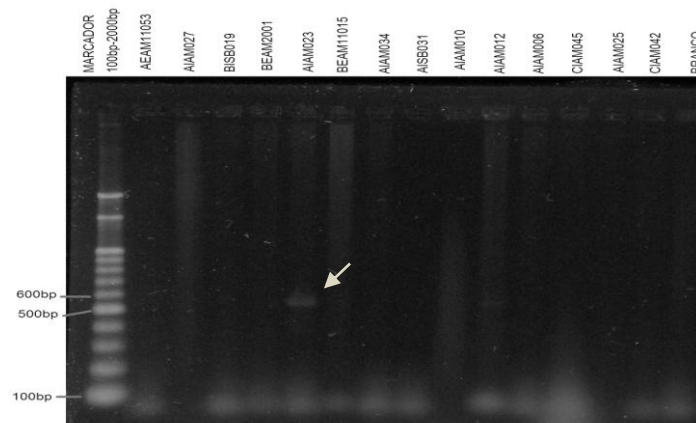


Figura 28. Resultado da PCR para a amplificação do gene *nor1*, gene para o ácido norsolorínico, mostrando resultado positivo para o isolado AIAM023.

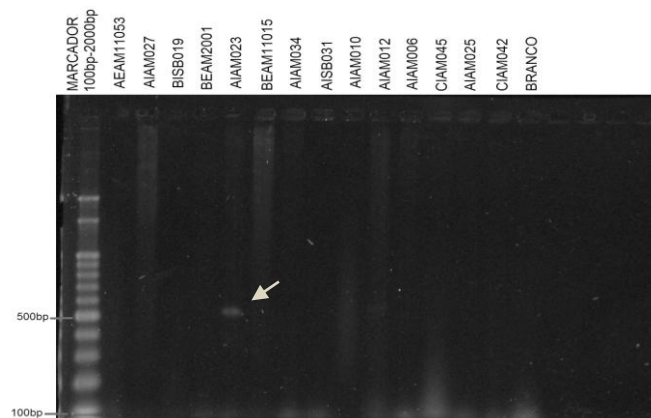


Figura 29. Resultado da PCR para a amplificação do gene *ver1*, gene para versicolorina, mostrando resultado positivo para o isolado AIAM023.

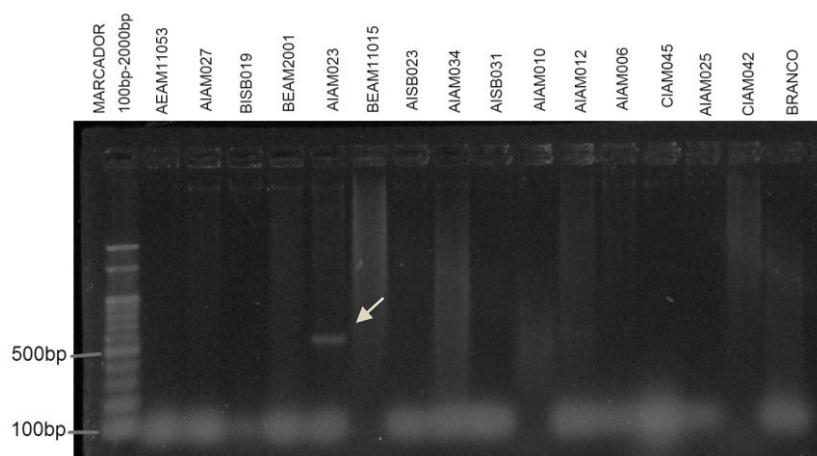


Figura 30. Resultado da PCR para a amplificação do gene *omtA*, gene para O-metilesterigmatocistina, mostrando resultado positivo para o isolado AIAM023.

6. CONCLUSÕES

- Foram obtidos 207 fungos endofíticos do isolamento de frutos maduros de *Theobroma grandiflorum*, destes 156 foram identificados taxonomicamente em nível de gênero e 85 apresentaram potencial para a produção de pigmentos naturais.
- Dos isolados obtidos, 17 foram identificados taxonomicamente como *Penicillium purpurogenum*, por métodos morfológicos e moleculares, todos eles produtores de um pigmento vermelho extracelular, tanto em meio líquido como sólido.
- O pigmento vermelho obtido é produzido pelos isolados em curto espaço de tempo (7 a 8 dias de incubação), na ausência ou presença de luz, em temperatura ambiente e em meio de cultivo simples (Batata Dextrose Ágar).
- Os ensaios de estabilidade realizados demonstraram que o pigmento vermelho produzido por estes isolados apresentou alta estabilidade em relação a mudanças de temperatura, pH e luminosidade, inclusive em condições extremas como congelamento, liofilização e aquecimento em forno de micro-ondas.
- Os bioensaios realizados, tanto com o extrato puro pigmentado do cultivo dos isolados como a fração butanólica obtida da partição do extrato puro, demonstraram que o pigmento obtido não possui atividade antibiótica para os micro-organismos testadores (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Candida albicans*), o que seria um

indicativo de que esta seria uma substância atóxica e que o isolado estudado não produz substâncias tóxicas.

- Observou-se que a fração butanólica do extrato do isolado *P. purpureogenum* CIAM 045 apresentou atividade antioxidante, este resultado favorece a utilização deste pigmento em cosméticos e alimentos para consumo humano.
- O extrato puro exudado do cultivo e a fração butanólica do extrato pigmentado de *P. purpureogenum* CIAM045 não apresentaram atividade citotóxica contra *Artemia salina* nos ensaios de toxicidade realizados.
- As análises bioquímicas realizadas, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida e ressonância magnética nuclear, indicam que este pigmento pertence à família das antraquinonas.
- A fração butanólica do pigmento precisa ser melhor purificada e as análises em CLAE e RMN refeitas para obter-se a determinação estrutural da molécula.
- As análises moleculares para a detecção da presença de genes responsáveis ou associados a produção das micotoxinas ocratoxina A, patulina e aflatoxina demonstram que as linhagens *P. purpureogenum* CIAM042 e *P. purpureogenum* CIAM042 não produzem tais toxinas e também não possuem o potencial para sua produção.
- Os resultados obtidos com os ensaios biológicos e bioquímicos do pigmento vermelho obtido do isolado *P. purpureogenum* CIAM045, demonstram que este apresenta um grande potencial para sua utilização como colorante de cosméticos e alimentos, pois possui estabilidade química, é facilmente dissolvido em água, possui atividade antioxidante, é produzido em um curto espaço de tempo e não apresenta toxicidade.

7. REFERÊNCIAS

- ALI, M. & BASHIER, S.A.. Effect of fast Green dye on some biophysical properties of thymocytes and splenocytes of albino mice. **Food Addit. Contam**, 23: 452-461, 2006.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J. KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual: Isolamento de micro-organismos endofíticos**. Piracicaba: Calq, 2002.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Eletronic Journal of Biotechnology**, 3(1): 40-65, 2000.
- BALESTRIN, L. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae. Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- BETINA, V. Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Elsevier, Amsterdam, 1989. In: GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **System. Applied Microbiology**. 19: 388-392 (1996).
- BOBBIO, P. A. e F. O. BOBBIO. **Química do Processamento de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela Ltda. 1995. 151 p.
- BOGS, C.; BATTILANI, P.; GEISEN, R. Development of molecular detection and differentiation system for ochratoxin A production *Penicillium* species and its applications to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. **International Journal of Food Microbiology**. 107:39-47. 2006
- BOONYAPRANAI, K.; TUNPRADIT, R.; LHIEOCHAIPHANT, S.; PHUTRAKUL, S. Optimization of submerged culture for the production of naphthoquinones pigment by *Fusarium verticillioides*. **Chiang Mai Journal. Science**, 2008, 35(5): 457-466.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, 28:25-30. 1995.
- BRASIL. Ministério das Relações Exteriores. Regulamento Técnico: atribuição de aditivos e seus limites máximos para a categoria de alimentos 19: sobremesas. MERCOSUL/GMC/RES N° 54/98. **XXXII GMC, Rio de Janeiro**, 8 de Dezembro de 1998.

BRASIL. Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamentação de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia. Portaria nº 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997. **Diário Oficial da União**, 28 de Outubro de 1997.

BUCHI, G.; WHITE, J.D.; WOGAN, G.N.. The structures of mitorubrin and mitorubrinol. **Journal of the American Chemical Society**. 87: 3484-3489, 1965.

CARY, J.W.; KLICH, M.A.; BELTZ, S.B.. Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycologia**, 97(2):425–432. 2005

CASSA-BARBOSA, L.A. Enzimas de interesse biotecnológico produzidas por fungos endofíticos de *Copaifera multijuga* Hayne. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, DF. 110p., 2001.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

COSTA NETO, P.Q. Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) e caracterização genética através de marcadores moleculares. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos/Universidade do Amazonas, São Carlos, SP, 123p., 2002.

COSTA PINTO, L.S.R.; AZEVEDO, J.L.; PEREIRA, J.O.; VIEIRA, M.L.; VIEIRA, C.; LABATE, C.A. Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. **New Phytologist**, 147: 609-615, 2000.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M.P.; PASTORE, G.M.; OLIVEIRA, J.G. Compostos de aroma por *Geotrichum fragrans* cultivado em maniueira. *apud* DAPKEVICIUS, A., VENSKUTONIKS, H.; BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **Journal of Science Food Agriculture**, 77, 1998.

DAPKEVICIUS, A., VENSKUTONIKS, H.; BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **Journal of Science Food Agriculture**, 77, 1998.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Escola**, 7: 21-25, 1998.

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

DREYFUSS, M. & PETRINI, O. Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. **Botanica Helvetica**, Basel, 94:33-40, 1984.

DUFOSSÉ, L.. Microbial production of food grade pigments. **Food Technology and Biotechnology**, 44 (3): 313-321, 2006.

DUFOSSÉ, L.; GALOUP, P.; YARON, A.; ARAD, S.M.; BLANC, P.; MURTHY, K.N.C.; RAVINSHANKAR, G. A.. Microorganisms and microalgae sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, 16: 389-406, 2005.

DURAN, N.; TEIXEIRA, F.S.; ESPOSITO, E.. Pigmentos fúngicos e seu potencial biotecnológico. *In*: ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J.L. **Fungos: Uma Introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, Educs, Cap. 9, p. 289-310, 2004.

FIGUEIREDO, M.B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, 63(1/2): 73-82, 2001.

FORSYTHE, S.J.. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Artmed, Porto Alegre. Cap. 5, p. 197-200, 2002.

FRANCIS, F.J. Lesser-Know Food Colorants. **Journal of Food Technology**. 52,63-67, 1987.

GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **System. Applied Microbiology**. 19: 388-392, 1996.

GHISALBERTI, E.L. Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. *In*: COLEGATE, S.M. & MOLYNEUX, R.J. **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination** . 2 ed. Boca Raton: CRC Press. P. 15-18, 2008.

GILL, M. 2003. Pigments of fungi (Macromycetes). **Natural product Reports**. 20:615-639, 1999.

GONZÁLES, A. M.; PRESA, M.; LATORRE, M. G.; LURÁ, M. C. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. **Revista Iberoamericana de Micología**. 24: 59-61. 2007.

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

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C.. Antioxidant defenses. *In*: **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed., Clarenton Press, Oxford. p.105-245.1999.

HARWIG, J. & SCOTT, P. M. Brine Shrimp (*Artemia salina*) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied Microbiology**. 21(6): 1011- 1016, 1971.

HAWKSWORTH, D.L., Fungal diversity and its implications for genetic resource collections, **Studies in Mycology**, 50(9): 9-18, 2004.

HE, J. & GIUSTI, M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**. 1: 163-188. 2010.

HOBSON, D.K & WALES, D.S. Green dyes. **Journal of the Society of Dyers and Colourists**. 114:42-44.1998.

HOBSON, D.K., EDWARDS, R.L., WALES, D.S. Cyanodontin: a secondary metabolite and dyestuff intermediate. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**. 70: 343-348. 1997.

HODGES, F.A.; ZUST, J.R.; SMITH, H.R.; NELSON, A.A.; ARMBRECHT, B.H.; CAMPBELL, A.D.. Mycotoxins: aflatoxin isolated from *Penicillium puberulum*. **Science**, 145 (3639): 1439 -1439, 1964.

HOHLER, D. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. Z. Ernähr.wiss. 37: 2-12, 1998. *In*: BOGS, C.; BATTILANI, P.; GEISEN, R. Development of molecular detection and differentiation system for ochratoxin A production *Penicillium* species and its applications to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. **International Journal of Food Microbiology**. 107:39-47. 2006

HUSSEIN, H. S. & BRASEL, J.M.. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology** 167(2): 101-134, 2001.

JAY, J.M.. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª Ed. Arned, Porto Alegre. Cap. 30, p. 633-650, 2005.

JIANG, J.Y.; LI, H.B.; CHEN, F.; HYDE, K.D. Production potential of water-soluble *Monascus* red pigment by a newly isolated *Penicillium* sp.. **Journal of Agricultural Technology**. 1(1): 113-126, 2005.

LARSEN, T.O. & HANSEN, M.A.E. Dereplication and Discovery of Natural Products by UV Spectroscopy. *In*: COLEGATE, S.M. & MOLYNEUX, R.J. **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press . Cap. 8, p. 221-244, 2008.

LU, H.; ZOU, W.X.; MENG, J.C.; HU, J.; TAN, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science** 151:67–73, 2000.

MAIMOM, D. **Estudo de mercado de matéria-prima: Corantes naturais cosméticos, indústria de alimentos), conservantes e aromatizantes,**

bioinseticidas e óleos vegetais e essenciais (cosméticos e oleoquímica): PROJETO BRA/96/025 - Acordo SUDAM/PNUD, Rede Para Conservação e Uso Dos Recursos Genéticos - GENAMAZ. 2005 2000.

MAPARI, S.A.S.; MEYER, A.S.; THRANE, U.. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54 (19): 7027-7035, 2006.

MAPARI, S.A.S.; MEYER, A.S.; THRANE, U.; FRISVAD, J.C. Identification of potentially safe promissin fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell factories**. 8: 24-38, 2009.

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**, 16: 231-238, 2005.

MARGALITH, P.Z. **Pigment microbiology**, New York, Chapman & Hall, 156 p.1992.

MASCARENHAS, J. M. O. S., P.C.; LARA, J.E.; REIS, F.P. O perfil das indústrias produtoras de corantes. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**., 3 (1): 1-9. 1999.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**. 32: 513 – 524. 1998.

MEDEIROS-GALVÃO, R.S. Variabilidade genética detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais freqüentes, isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos/Universidade do Federal Amazonas, São Carlos, SP, 151p. 1998.

MELO, I.S. Recursos genéticos microbianos. *In*: MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C., **Recursos genéticos e melhoramento - micro-organismos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. Cap 1, p. 1-48, 2002.

MENDEZ FILHO, J.D. & RODRIGUEZ, H.G.R.. Sobre los beneficios de los radicales libres. **Revista Médica Del IMSS**. 35(4):309-13. 1997

MICHEL, A.S.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. **Science**, 123 (3194): 464, 1956.

MOAKE, M.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; WOEOBO, R.W.. Comprehensive review of patulin control methods in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 4: 8-21, 2005.

MORTENSEN, A.. Carotenoids and other pigments as natural colorants. **Pure Applied Chemistry**. 78(8): 1477-1491, 2006.

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

MOSADDIK, M.A.; FOSTER, P.I.; BOOTH, R.; WATERMAN, P.G. Phenolic glycosides from some Australian species of Flacourtiaceae (*Salicaceae sensulato*). **Biochemical Systematics and Ecology**. 35:166-168, 2007.

MOSS, M.. Mycotoxin review – 1. Aspergillus and Penicillium. *Mycologisty*, 16 (3): 116-119, 2002.

NUNEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant therapy: myth or reality? **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 16(4): 699-710, 2005.

PADILLA, G. Manipulação genética e molecular de actinomicetos produtores de antibióticos. 10. *In: Recursos genéticos e melhoramento - micro-organismos*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. MELO, I.S.; Cap. 10, p. 245-262, 2002.

PAPAS, A.M. Diet and antioxidant status. **Food and Chemical Toxicology**. 37:999-1007. 1999.

PARISOT, D.; DEVYS, M.; BARBIER, M. Nahthoquinone pigments related to fusarubin from the fungus *Fusarium solani* (Mart) Sacc. **Microbios**. 64:31-47. 1990.

PASTRANA, L.; BLANC, P. J.; SANTERRE, A. L.; LORET, M. O.; GOMA, G.. Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. **Proc. Biochemistry**. 30, 333-341, 1995.

PATERSON, R.R.M.; VENANCIO, A.; LIMA, N. A practical approach for identification based on mycotoxin characters of *Penicillium*. **Revista Iberoamericana de Micología**. 23: 155-159. 2006.

PEIXOTO NETO, P.; AZEVEDO J.; CAETANO, L. Micro-organismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales e Aromáticas**. 3(4):69-72, 2004.

PTZINGER, E. & ZIEGLER, K.. Ochratoxin A from toxicological perspective. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**. 23: 91-98, 2000.

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

REN, Y.; STROBEL, G.A.; GRAFF, J.C.; JUTILA, M.; PARK, S.G.; GOSH, S.; TELOW, D.; CONDRON, E.P.; HESS, W.M.; MOORE, E. Colutellin A, an immunosuppressive peptide from *Colletotrichum dematium*. **Microbiology**, 154:1973-1979, 2008.

ROBERTS, J.C. & WARREN, C.W.H.. Studies in mycological chemistry. Part IV. Purpurogenone a metabolic product of *Penicillium purpurogenum* Stoll. **Journal of the Chemical Society**. p. 2992-2998, 1955

RODRIGUES FILHO, E.M. Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae). Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2010.

RODRIGUES, K.F. & DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. Bumidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 31(12) 905-909, 1996.

RODRIGUES, K.F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Micologia**, 86:376-85, 1994.

RONDON, A.C.F. Atividade amilolítica de fungos endofíticos isolados de *Manihot esculenta* Crantz. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 100p., 2003.

SAM, T.W. Toxicity testing Using the Brine Shrimp *Artemia salina*. In: **Bioactive Natural Products**. Ed. S.M. Colgate and R.J. Molyneux. CRC Press. Boca Raton. 1993. p. 442-456.

SANZANI, S.M.; REVERBERI, M.; PUNELLI, M.; IPPOLITO, A.; FANELLI, C.. Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*. 153: 323-331, 2012.

SILVIA, T.M.S; BATISTA, M. M.; CAMARA, C. A.. Camara CA, Agra MF. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. **Ann Trop Med Parasit**, 4: 419-425, 2005

SHAMI, N.J.I & MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**. 17(2): 227-236. 2004.

SHIBAMATO, T. & BJELDANES, L.F. Fungal toxins occurring in foods . In: **Introduction to Food Toxicology** . Academic Press Inc . London, UK . Cap. 6, pp 97 – 116, 1993.

SHIN, C.S. Productivity increase of *Monascus* pigments. Jpn. Kobai Tokkyo Koho JP, **Chemistry Abstracts**, 128:101-172, 1998.

SIEBER, T.; RIESEN, T.K.; MULLER, E.; FRIED, P.M. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berck.) Cast. & Germ. = *Septoria nodorum* (Berk.) Berck. **Journal of Phytopathology**, 122: 289-306, 1988.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed, Editora LTC, Rio de Janeiro. 2007.

SKOOG, D. A. & LEARY, J. J., High-Performance liquid Chromatography *In: Principles of Instrumental Analysis*, 4 ed., Harcourt Brace College Publishers, Flórida. p 628 – 669, 1992.

SOLOMONS, G. & FRYHLE, C.B.. Química orgânica. Vol 1, 9 ed., Editora LTC, Rio de Janeiro, 2009.

SOUZA, A.Q.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de plantas tóxicas da amazônia: *Pausicorea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* Benth. **Acta Amazônica**, 34(2): 185-195, 2004.

STROBEL, G. & CASTILLO, U. Sourcing Natural Products from Endophytic Microbes. *In: COLEGATE, S.M. & MOLYNEUX, R.J. Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination* . 2 ed. Boca Raton: CRC Press . Cap. 13, p. 371-390 2008.

STROBEL, G. & DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 67(4): 491–503, 2003.

STROBEL, G. A.; LI, J. Y.; SUGAWARA, F.; KOSHINO, H.; HARPER, J.; HESS, W. M. Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. **Microbiology**, 145: 3557 – 3564, 1999.

TANAKA, H.; KOYAMA, Y.; AWAYA, J.; MARUMO H.; OIWA, R.; KATAGIRI, M.; NAGAI, T.; OMURA, S. Nanaomycins, new antibiotic produced by strain of *Streptomyces*.1. Taxonomy, isolation, characterization and biological properties. **Journal of Antibiotics**. 28: 860-867, 1975.

UNAGUL, P.; WONGSA, P.; KITTA KOOP, P.; INTAMAS, S.; SRIKITIKULCHAI, P.; TANTICHAROEN, M. Production of red pigments by insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 32: 135-140, 2005.

WILHELM-FILHO, D.; DA SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de Plantas Medicinais e Alimentos: Importância e Perspectivas Terapêuticas. *In*: YUNES, R.A. & CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Editora Argós, Chapecó. p 523. 2001.

WISSGOTT, U. & BORTLINK, K. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science Technology**. 7:298-302, 1996.

YU, J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.. Complete sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. **FEBS Letters**, 564:126-130, 2004.

YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó, Argos - Editora Universitária, 500p., 2001.

8. APENDICES

SEQUENCIAS, CONTRASTE DE SEQUENCIAS COM O GenBank e BLAST

Apêndice 01

CIAM 045 - Sequência de região ITS, contraste com o GenBank com o programa Blast.

TGCTCGCGGTACTCCTACTGATCGAGTTACCGTGGAAAAAATATGGAA
GACAACGCCCGTAGATCCTTCCGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCG
AGGACCTAGGCGGGCGTCGCCACTGCCTTTAGGCAGGTCCCCAGGGGAC
CACACCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGAAATGACGCTCGGACAGG
CATGCCCCCGGAATGCCAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGA
TTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC
ATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTCTTGATTATTATCAA
TCATGCTCAGACAGTCCATCTTCATTAGGGTCAACGGCGCTCTGGCGGGC
ACGGGCCAGGGGCAAGTGCCCTCGGCGACTGGGGATTCCCAGTGGGGC
CCCGCCAAAAGGCAACAGGGTTATTACCAAGAGACAAGGGTGGGAAGGTC
CGGTCCACGAAGGGACCGGGTATTAGTTAATGAATCTTCCGCAGGTTAC
TACCGGAAAGGGGTTTCCCTTCTCTTCCCTACTCCCTTTTTTCTCTCT
TTTCTTCTTCTTTTGCCGCGCCCTGGGCTTCTCCTCTCCTTCTGCGC
CTTGGG

Quality lower than 10
Quality between 10 and 20
Quality between 21 and 30
Quality higher than 31

PHPH developed by: Roberto Togawa and Marcelo Brígido

Query ID : lcl|38875 Molecule type: nucleic acid Query Length: 510

Description : All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Program BLASTN 2.2.22+

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
FJ237500.1	Fungal endophyte sp. SX01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	833	833	98%	0.0	96%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
DQ681328.1	Penicillium purpurogenum isolate 119 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	811	811	98%	0.0	95%

>  [gb|FJ237500.1](#) Fungal endophyte sp. SX01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence
Length=610

Score = 833 bits (451), Expect = 0.0
Identities = 492/509 (96%), Gaps = 14/509 (2%)
Strand=Plus/Minus

>  [gb|DQ681328.1](#) Penicillium purpurogenum isolate 119 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=609

Score = 811 bits (439), Expect = 0.0
Identities = 489/510 (95%), Gaps = 16/510 (3%)
Strand=Plus/Minus

Apêndice 02

AIAM 006 - Sequência de região ITS, contraste com o GenBank com o programa Blast.

ATCTACGAGTATCNCATCCCCCTGGTTAACATACTAACGTTGCTTCGG
CGGGAATAGACGGCCCGTGAAACGGGCGCCCGCCAGAGGACCCTTAA
CTCTGTTTCTATAATGTTTCTTCTGAGTAAACAAGCAAATAAATTTAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT
ACAACCCTCAGGCCCGCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAGCCTCTCTG
TGGGCACACGCCGTCCCCCAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGAGCTTCCAT
CGCGTAGTAGCTAACACCTCGCGACTGGAGAGCGGCGCGGCCACGCCGTTA
AAAACCAAATCTTCTGAAGTTGACCTCGAATCAGGTACGAATACCGCTGA
ACTTAAGCATTATCCATACGCGGG

Quality lower than 10
Quality between 10 and 20
Quality between 21 and 30
Quality higher than 31

PHPH developed by: Roberto Togawa and Marcelo Brigido

Query ID: lcl|54167 Molecule type: nucleic acid Query Length: 459

Description: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Program BLASTN 2.2.22+

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
FJ613090.1	Fungal sp. ARIZ B522 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	791	791	96%	0.0	98%
EU727452.1	Fusarium solani isolate 14.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	791	791	96%	0.0	98%
EU727451.1	Fusarium solani isolate 12.4B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	791	791	96%	0.0	98%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU727450.1	Fusarium solani isolate 12.4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	791	791	96%	0.0	98%

>  [gb|FJ613090.1](#) Fungal sp. ARIZ B522 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=477

Score = 791 bits (428), Expect = 0.0

Identities = 440/445 (98%), Gaps = 3/445 (0%)

Strand=Plus/Plus

>  [gb|EU727452.1](#) Fusarium solani isolate 14.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=533

Score = 791 bits (428), Expect = 0.0

Identities = 440/445 (98%), Gaps = 3/445 (0%)

Strand=Plus/Plus

>  [gb|EU727451.1](#) Fusarium solani isolate 12.4B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=545

Score = 791 bits (428), Expect = 0.0

Identities = 440/445 (98%), Gaps = 3/445 (0%)

Strand=Plus/Plus

>  [gb|EU727450.1](#) Fusarium solani isolate 12.4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=547

Score = 791 bits (428), Expect = 0.0

Identities = 440/445 (98%), Gaps = 3/445 (0%)

Strand=Plus/Plus

Apêndice 03

Listagem de DNA de isolados encaminhados para seqüenciamento.

AEAM11023	AIAM030	AISB026	BEAM11015
AEAM11043	AIAM034	AISB029	BISB005
AEAM1104A	AIAM036	AISB030	BISB015
AEAM1104B	AIAM038	AISB031	BISB016
AEAM11053	AIAM039	AISB035	BISB017
AEAM21015	AIAM043	AISB041	BISB018
AEAM31104A	AIAM045	AISB044	BISB019
AEAM5001	AIAM046	AISB31023	BISB028
AENA21023	AIAM047	AISN005	BISB029
AIAM006	AIAM048	BEAM1001	BISB036
AIAM008	AIAM050	BEAM2001	BISB037
AIAM010	AIAM051	BEAM310013	CEAM5001
AIAM010set	AIAM20A	BENA11033	CIAM037
AIAM012	AINA026	BENA21013	CIAM040
AIAM017	AISB001	BESB31013	CIAM042
AIAM019	AISB003	BIAM029	CIAM045
AIAM020	AISB010	BIAM038	CIAM2001
AIAM022	AISB018	BIAM040	CISB018
AIAM023	AISB019	BIAM049	CISB022
AIAM027	AISB020	BIAM056	CISB029
AIAM028	AISB023	BIAM062	
AIAM029	AISB024	BEAM049	