

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Marina Del Bianco Sousa

**Estudo da Produção de Pigmento por Linhagem Endofítica de *Talaromyces
minioluteus/ Penicillium minioluteum* em Diferentes Temperaturas**

**São Carlos
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Estudo da Produção de Pigmento por Linhagem Endofítica de *Talaromyces
minioluteus/ Penicillium minioluteum* em Diferentes Temperaturas**

Marina Del Bianco Sousa

Alberto Colli Badino Júnior
Orientador - PPG-EQ/UFSCar

Álvaro de Baptista Neto
Co-orientador – DBB/UNESP-Araraquara

Dissertação de mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração em **Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos**.

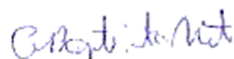
São Carlos
2018

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MARINA DEL BIANCO SOUSA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 26 DE FEVEREIRO DE 2018.

BANCA EXAMINADORA:



Alberto Colli Badino Junior
Orientador, UFSCar



Álvaro de Baptista Neto
UNESP



Marcel Otávio Cerri
UNESP



Cristina Paiva de Sousa
UFSCar



Fernanda Perpétua Casciadori
UFSCar

*Aos meus pais, Renato e Mônica,
e ao meu irmão, Ricardo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por seu amor infinito e por me conceder a perseverança e a sabedoria espiritual necessárias para a execução deste trabalho.

Ao meu irmão, Ricardo, e aos meus queridos pais, Renato e Mônica, que me apoiaram, me confortaram nos momentos de dificuldade e não mediram esforços para que esse trabalho fosse concluído.

Agradeço também aos meus orientadores Prof. Dr. Alberto Colli Badino e Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto, pelo apoio, por todo conhecimento compartilhado, pela paciência, pela disponibilidade e solicitude constante, e sobretudo, pela amizade.

Aos meus colegas de laboratório, pelo companheirismo, sempre disponíveis a contribuir e ajudar.

Aos profissionais que gentilmente aceitaram o convite para comporem a banca examinadora e contribuírem com o enriquecimento deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade concedida.

Ao CNPq pela confiança depositada e suporte financeiro.

E por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram e auxiliaram na realização deste trabalho.

*“O impossível reside nas mãos inertes
daqueles que não tentam.”*
(Epicuro)

RESUMO

Diante dos riscos oferecidos pelos pigmentos sintéticos aos seres humanos e ao meio ambiente, bem como do crescente interesse global por produtos mais saudáveis e naturais, o estudo e interesse pela produção e utilização de pigmentos naturais vem se tornando cada vez mais atraente, em virtude de serem menos nocivos à saúde humana e à natureza. Uma promissora fonte alternativa para a obtenção de pigmentos naturais são os microrganismos, dentre os quais destacam-se os fungos filamentosos, uma vez que apresentam uma grande produtividade e são capazes de sintetizar compostos com uma vasta gama de cores. Neste contexto, o presente trabalho teve como intuito avaliar a produção de pigmento vermelho pelo fungo *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* em cultivos submersos sob diferentes temperaturas. Inicialmente, realizou-se um screening microbiológico de colônias fúngicas, via metodologia de plaqueamento, com o objetivo de isolar a linhagem endofítica de *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*. Após obtenção e isolamento da espécie foram analisados 8 diferentes meios de cultivo de modo a obter o meio mais favorável à síntese de pigmento vermelho. A avaliação através de cultivos submersos em frascos agitados conduzidos a 28°C, 250 rpm por 120 horas, mostrou que dentre as composições estudadas, o meio de cultivo que gerou a maior produção de pigmento vermelho foi o meio SABORAUD (meio 4), com concentração final de pigmento de aproximadamente 23,07 unidades de absorvância (UA) para um comprimento de onda de 500 nm. Avaliada a composição do meio de cultivo, cultivos submersos foram realizados em mesa incubadora rotativa a 250 rpm empregando o meio SABORAUD nas temperaturas de 20, 24, 28 e 32°C. Posteriormente, foram realizados cultivos em biorreatores de bancada de 4 L de capacidade útil a 400 rpm e 0,5 vvm, sob as mesmas condições de temperatura, com o objetivo de validar os resultados obtidos em incubador rotativo. Verificou-se que as maiores produções de pigmento vermelho ocorreram à temperatura de 24°C, com valores máximos de unidades de absorvância (UA) a 500 nm (ABS_{500}) e concentração aproximada de biopigmento de 41,40 UA e 8,07 g_{pigmento}/L , respectivamente. Avaliado o efeito da temperatura sobre o processo de síntese de pigmento vermelho, foram realizadas três rotinas de extração, cuja qual a rotina 3 fora empregada nas amostras de 20, 24 e 28°C de modo a obter uma relação entre a absorvância (ABS_{500}) e a concentração de pigmento (g_{pigmento}/L). Por fim, utilizando o modelo de crescimento celular de Contois, foram propostas duas modelagens cinéticas do processo, sendo a Modelagem A caracterizada por assumir a glicose como o único substrato limitante e o pigmento como um produto não associado ao crescimento, e a Modelagem B caracterizada por pressupor a produção de pigmento via um precursor oriundo do consumo da fonte de nitrogênio. Ambas apresentaram resultados satisfatórios, porém, a Modelagem B se mostrou a mais adequada para descrever o comportamento do bioprocesso. Sendo assim, diante dos resultados obtidos neste trabalho, verifica-se o potencial do fungo filamentoso endofítico *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* para obtenção do pigmento vermelho via cultivos submersos em diferentes temperaturas.

Palavras-chave: Pigmento Vermelho, *Talaromyces minioluteus*, *Penicillium minioluteum*, Cultivo Submerso, Meio de Cultivo, Concentração de Pigmento, Temperatura.

ABSTRACT

In view of the risks offered by synthetic pigments to humans and the environment, as well as the growing global interest in healthier and more natural products, the study and interest in the production and use of natural pigments has become increasingly attractive due to less harmful to human health and nature. A promising alternative source for obtaining natural pigments are microorganisms, among them are filamentous fungi, since they have a high productivity and are capable of synthesizing compounds with a wide range of colors. In this context, the present work aimed to evaluate the production of red pigment by the fungus *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* in submerged cultures under different temperatures. Initially, a microbiological screening of fungal colonies was carried out using a plating methodology, in order to isolate the endophytic strain of *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*. After obtaining and isolating the species in question, 8 different culture media were analyzed in order to obtain the most favorable for the red pigment production. Submerged cultures in shaken flasks conducted at 28 °C, 250 rpm for 120 hours, showed that the most successful medium to obtain a high production of red pigment was SABORAUD medium (medium 4) with a final pigment concentration of approximately 23.07 AU (Absorbance Unities) for a wavelength of 500 nm. Submerged fermentations using the SABORAUD medium were carried out in a rotating incubator at 250 rpm at temperatures of 20, 24, 28 and 32 °C. Subsequently, cultures were carried out in 4 L benchtop bioreactors of useful capacity at 400 rpm and 0.5 vvm under the same temperature conditions in order to validate the results obtained in a rotary incubator. As a result, the highest red pigment yields were observed at 24 °C, with absorbance values at 500 nm (ABS₅₀₀) and approximate red pigment concentration of 41.40 AU and 8.07 g_{pigment}/L, respectively. Evaluated the effect of temperature on the red pigment synthesis process, three extraction routines were performed, which routine 3 was used in samples of 20, 24 and 28°C in order to obtain a ratio between absorbance (ABS₅₀₀) and pigment concentration (g_{pigment}/L). Finally, using the Contois cell growth model, two kinetic modeling of the process was proposed, Modeling A being characterized by assuming glucose as the only limiting substrate and the pigment as a product not associated with growth, and Modeling B characterized for presuming the production of pigment via a precursor from the consumption of the nitrogen source. Both presented satisfactory results, however, Modeling B was the most adequate to describe the behavior of the bioprocess. Thus, the results obtained in this work show the potential of the endophytic fungus *Talaromyces minioluteus* / *Penicillium minioluteum* to obtain the red pigment via cultures submerged at different temperatures.

Keywords: Red Pigment, *Talaromyces minioluteus*, *Penicillium minioluteum*, Submerged Culture, Culture Medium, Pigment Concentration, Temperature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - William Henry Perkin (A), nome inspirado na flor de malva (B), o corante (C) e a molécula de mauveína (D).....	20
Figura 3.2 - Material e a estrutura química do corante Tartrazina.....	21
Figura 3.3 - Material e estrutura molecular do corante Verde Rápido CFC.....	21
Figura 3.4 - Material e estrutura molecular do corante Carmim de Índigo/ Azul de Indigotina.....	22
Figura 3.5 - Materiais e estrutura molecular do corante Eritrosina.....	22
Figura 3.6 - Micromorfologia de fungos filamentosos do gênero <i>Penicillium</i> - A: Conidióforos com fiálides solitárias; B: Monoverticilado; C: Divaricato; D e E: Biverticilado; F: Terverticilado; G: Poliverticilado.....	30
Figura 3.7 - Estrutura geral da molécula antraquinona, sendo R1 a R8 seus substituintes laterais.....	33
Figura 4.1 - Esquema de preparo do inóculo.....	43
Figura 4.2 - Esquema do ensaio para avaliação da composição do meio de cultivo.....	46
Figura 4.3 - Esquema do cultivo em frascos agitados em diferentes temperaturas.....	47
Figura 4.4 - Biorreatores de bancada.....	48
Figura 4.5 - Esquema experimental dos ensaios em biorreatores de bancada.....	49
Figura 4.6 - Procedimentos de extração realizados com amostras do caldo de cultivo conduzido a 20°C.....	51
Figura 5.1 - Colônias obtidas em placa de Petri contendo meio sólido Ágar ISP2, após 5 dias de incubação.....	59
Figura 5.2 - Colônias obtidas em placa de Petri contendo meio sólido Ágar ISP2, após 10 dias de incubação.....	60
Figura 5.3 - (A) Exsudato entre colônias 1 e 3 e (B) Exsudato entre colônias 1 e 6.....	60
Figura 5.4 - (A) Contagem “Colônias 1” (Frente) e (B) Contagem “Colônias 1” (Verso).....	61
Figura 5.5 - (A) “Slants” - Estoque de trabalho (frente), (B), “Slants” - Estoque de trabalho (verso) e (C) Exsudato no “slant” da cultura estoque de trabalho.....	61
Figura 5.6 - Variação do pH ao longo do tempo nos cultivos em frascos agitados com diferentes meios de cultura.....	62

Figura 5.7 - Produção de pigmento vermelho (ABS_{500}) ao longo do tempo nos cultivos em frascos agitados com diferentes meios de cultura.....	63
Figura 5.8 - Erlenmeyers com os caldos de cultivos dos 8 meios de cultura avaliados ao final de 120 horas de cultivo.....	64
Figura 5.9 - Variações de pH, concentração de glicose (C_S), concentração de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em frascos agitados a 20°C.....	66
Figura 5.10 - Variações de pH, concentração de glicose (C_S), concentração de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em frascos agitados a 24°C.....	66
Figura 5.11 - Variações de pH, concentração de glicose (C_S), concentração de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em frascos agitados a 28°C.....	67
Figura 5.12 - Variações de pH, concentração de glicose (C_S), concentração de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em frascos agitados a 32°C.....	67
Figura 5.13 - Sobrenadantes dos caldos de cultivo a 32°C em diferentes tempos de cultivo em frascos agitados.....	68
Figura 5.14 - Análise do consumo de glicose com a síntese de pigmento ao longo do ensaio de 24°C em frascos agitados.....	70
Figura 5.15 - Variações de pH, concentração de glicose (C_S), concentração de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em biorreator a 20°C.....	72
Figura 5.16 - Variações de pH, concentração de glicose (C_S), concentração de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em biorreator a 24°C.....	72
Figura 5.17 - Variações de pH, concentração de glicose (C_S), concentração de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em biorreator a 28°C.....	73
Figura 5.18 - Análise do consumo de glicose com a síntese de pigmento ao longo do Ensaio de 24°C em biorreator.....	74
Figura 5.19 - Ajuste do modelo linear aos dados experimentais de ABS_{500} em função da concentração de sólidos solúveis no Caldo Tratado (C_{SSCT}).....	75
Figura 5.20 - Ajuste do modelo linear aos dados experimentais de ABS_{500} em função da concentração de pigmento extraído (C_{PE}) referente ao Procedimento 2.....	76
Figura 5.21 - Ajuste do modelo linear aos dados experimentais de ABS_{500} em função da concentração de pigmento extraído (C_{PE}) referente ao Procedimento 3.....	76

Figura 5.22 - Ilustração do Procedimento de Extração 2.....	78
Figura 5.23 - Ilustração do Procedimento de Extração 3.....	79
Figura 5.24 - Variações das produtividades em pigmento volumétrica (P_p em $g_p/L.h$) (A) e específica ($P_{p/X}$ em $g_p/g_X.h$) (B) ao longo dos cultivos a 20 (●), 24 (●) e 28°C (●) em frascos agitados.....	80
Figura 5.25 - Variações das produtividades em pigmento volumétrica (P_p em $g_p/L.h$) (A) e específica ($P_{p/X}$ em $g_p/g_X.h$) (B) ao longo dos cultivos a 20 (●), 24 (●) e 28°C (●) em biorreator.....	81
Figura 5.26 - Concentração máxima (C_{pmax} em g_p/L) e produtividade volumétrica máxima em pigmento (P_{pmax} em $g_p/L.h$) em função da temperatura obtidas nos cultivos em frascos agitados.....	82
Figura 5.27 - Concentração máxima (C_{pmax} em g_p/L) e produtividade volumétrica máxima em pigmento (P_{pmax} em $g_p/L.h$) em função da temperatura obtidas nos cultivos em biorreatores.....	82
Figura 5.28 - Escala de cores obtida no Ensaio a 24°C em frascos agitados.....	83
Figura 5.29 - Gráfico comparativo entre os valores simulados pelo modelo A (—) e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 20°C.....	84
Figura 5.30 - Gráfico comparativo entre os valores simulados pelo modelo A (—) e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 24°C.....	85
Figura 5.31 - Gráfico comparativo entre os valores simulados pelo modelo A (—) e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 28°C.....	86
Figura 5.32 - Gráfico comparativo entre os valores simulados de C_X (—), C_S (—), C_P (—), C_{PR} (—) e C_{FN} (—) pelo modelo B e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 20°C.....	88
Figura 5.33 - Gráfico comparativo entre os valores simulados de C_X (—), C_S (—), C_P (—), C_{PR} (—) e C_{FN} (—) pelo modelo B e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 24°C.....	89
Figura 5.34 - Gráfico comparativo entre os valores simulados de C_X (—), C_S (—), C_P (—), C_{PR} (—) e C_{FN} (—) pelo modelo B e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 28°C.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Classificação e exemplos de pigmentos naturais.....	23
Tabela 3.2 - Algumas espécies fúngicas produtoras de pigmentos.....	27
Tabela 3.3 - Alguns pigmentos naturais produzidos por fungos filamentosos.....	32
Tabela 4.1 - Composições de meio de cultivo avaliadas no bioprocesso.....	44
Tabela 5.1 - Resultado da análise estatística pelo Método de Tukey das produções de pigmento obtidas com os diferentes meios de cultivo.....	65
Tabela 5.2 - Resultado da análise estatística pelo Método de Tukey das produções de pigmento obtidas nos cultivos em frascos agitados sob diferentes temperaturas.....	70
Tabela 5.3 - Análise estatística dos cultivos em biorreatores sob diferentes temperaturas via Método de Tukey	74
Tabela 5.4 - Comparação entre as eficiências de recuperação (ER em %) e a porcentagem de pigmento presente no caldo tratado original (PCTO em %) dos procedimentos de extração testados.....	77
Tabela 5.5 - Valores estimados dos parâmetros cinéticos para os cultivos de <i>Talaromyces minioluteus</i> / <i>Penicillium minioluteum</i> visando a produção de pigmento vermelho em biorreator a 20, 24 e 28°C (Modelagem A).....	87
Tabela 5.6 - Valores estimados dos parâmetros cinéticos para os cultivos de <i>Talaromyces minioluteus</i> / <i>Penicillium minioluteum</i> visando a produção de pigmento vermelho em biorreator a 20, 24 e 28°C (Modelagem B).....	91

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	PIGMENTO <i>VERSUS</i> TINTURAS (<i>DYES</i>).....	18
3.2	HISTÓRICO.....	19
3.3	CORANTES SINTÉTICOS <i>VERSUS</i> NATURAIS.....	20
3.4	FUNGOS FILAMENTOSOS COMO FONTE DE PIGMENTOS NATURAIS.....	25
3.4.1	<i>Fungos filamentosos</i>	25
3.4.2	<i>Metabólitos primários e secundários</i>	28
3.4.3	<i>Gênero Talaromyces/Penicillium</i>	29
3.4.4	<i>Metabólitos sintetizados por fungos filamentosos</i>	31
3.5	ANTRAQUINONAS.....	33
3.6	FATORES QUE INFLUENCIAM NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS FÚNGICOS.....	34
3.7	ESTRATÉGIAS DE CULTIVO PARA OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DE METABÓLITOS FÚNGICOS.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	MICROORGANISMO.....	41
4.2	TRIAGEM.....	41
4.3	ESTOQUE DE TRABALHO.....	42
4.4	PREPARO DO INÓCULO.....	43
4.5	AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO.....	44

4.6	CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	46
4.7	CULTIVOS EM BIORREATOR DE BANCADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	47
4.8	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	49
4.8.1	<i>Determinação do pH</i>	49
4.8.2	<i>Determinação da concentração celular</i>	49
4.8.3	<i>Determinação da concentração de glicose</i>	50
4.8.4	<i>Determinação da concentração de pigmento</i>	50
4.9	DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA (UA ₅₀₀) E CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTO (g/L).....	50
4.10	MODELAGEM CINÉTICA DO PROCESSO.....	54
4.11	AJUSTE DO MODELO E ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO BIOPROCESSO.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
5.1	TRIAGEM PARA ISOLAMENTO DA LINHAGEM E PREPARO DA CULTURA ESTOQUE DE TRABALHO.....	59
5.2	AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO.....	62
5.3	CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	65
5.4	CULTIVOS EM BIORREATOR DE BANCADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	71
5.5	DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA (ABS ₅₀₀) E CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTO.....	75
5.6	MODELAGEM CINÉTICA DO BIOPROCESSO – AJUSTE E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS.....	83
6	CONCLUSÕES.....	93
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

Os pigmentos, particulados sólidos e de baixa solubilidade, têm seu uso datado de muito tempo na história humana, sendo os primeiros pigmentos utilizados na história oriundos de fontes vegetais, animais e minerais (CHRISTIE, 2001; GÜRSES et al., 2016; HERBEST E HUNGER, 2004; RAO; XIAO E LI, 2017).

Com o passar do tempo, a evolução humana e tecnológica acabou contribuindo para o aumento da demanda e do uso de pigmentos, o que impulsionou o desenvolvimento de estudos e pesquisas por processos que os sintetizassem de forma mais ágil e econômica. A estes pigmentos, oriundos em sua grande maioria de processos químicos, atribuiu-se a denominação de corantes sintéticos.

O intenso e desenfreado uso destes corantes visando atender a demanda global, tempos depois acabou por resultar em sérias consequências tanto para os seres humanos quanto para o meio ambiente, visto que muitos destes corantes sintéticos apresentaram potenciais efeitos tóxicos, podendo causar sérios riscos a saúde humana e ao meio ambiente (BARROWS; LIPMAN E BAILEY, 2003; OGBONNA, 2016; PRADO E GODOY, 2003; WROLSTAD E CULVER, 2012).

Associado a este fato, a crescente demanda global por produtos mais saudáveis e naturais tem impulsionado até os dias de hoje o estudo e o desenvolvimento de tecnologias viáveis para a produção de pigmentos naturais oriundos de plantas, animais e microrganismos.

Dentre as diversas fontes naturais para obtenção de pigmentos, a utilização de microrganismos vem se destacando como uma promissora alternativa, uma vez que apresentam uma elevada produtividade e seus pigmentos, além de serem menos nocivos a saúde humana e ao meio ambiente, são de origem renovável e praticamente inesgotáveis e podem ser produzidos em pequenas áreas de forma ininterrupta, sem a existência de problemas sazonais (BICAS E DA SILVA, 2013; DUFOSSE et al., 2014; MAPARI et al., 2005; OGBONNA, 2016).

Uma das tecnologias que se encontram em expansão e apresenta um elevado potencial biotecnológico é a produção de pigmentos via fungos filamentosos. Alguns gêneros fúngicos, destacam-se por sintetizarem uma elevada e variada gama de metabólitos secundários, como antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, bem como os pigmentos (OGBONNA, 2016; RAO; XIAO E LI, 2017).

De modo geral, os pigmentos fúngicos além de exibirem uma elevada estabilidade a diferentes pHs e temperaturas, apresentam uma grande variedade desde sua coloração até as classes químicas que podem vir a constituir sua estrutura molecular (BONDIOLII;

MANFREDINI E OLIVEIRA, 1998; CHRISTIE, 2001; GÜRSES et al., 2016; HAKEIM; ARAFA E ABDOU, 2015), como por exemplo, as antraquinonas. Estas, em virtude de constituírem com certa relevância a composição de diversos metabólitos secundários sintetizados por fungos filamentosos incluindo os pigmentos, vêm estimulando o estudo de possíveis fatores físico-químicos que influenciem na produção destes metabólitos, bem como no desenvolvimento e emprego de estratégias de cultivo que possam vir a melhorar e otimizar a produção destes compostos.

Sendo assim, tendo em vista a importância e a demanda de consumo de pigmentos naturais, o estudo e a otimização da produção do pigmento vermelho gerado pela linhagem endofítica *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* através do emprego de fermentações submersas conduzidas sob diferentes temperaturas, mostram-se promissores e de efetiva contribuição ao tema.

2 OBJETIVOS

A presente pesquisa teve como objetivo analisar a produção de pigmento vermelho pelo fungo endofítico *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* por meio de fermentações submersas descontínuas conduzidas sob diferentes temperaturas.

Para atingir os objetivos pretendidos, foram executadas as seguintes etapas:

- ♦ Isolar e obter a espécie endofítica *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*, via screening microbiológico de colônias fúngicas;
- ♦ Determinar o meio mais favorável a produção de pigmento vermelho através de cultivos submersos conduzidos em frascos agitados utilizando 8 diferentes composições de meio de cultivo;
- ♦ Investigar o efeito da temperatura sobre a produção de pigmento em fermentações submersas descontínuas conduzidas em diferentes temperaturas em incubador rotativo;
- ♦ Validar os resultados obtidos em frascos agitados a partir de ensaios conduzidos em biorreatores de bancada;
- ♦ Obter uma relação entre Absorbância (ABS_{500}) e Concentração de Pigmento (g_{pigmento}/L);
- ♦ Descrever o processo de crescimento celular, consumo de substrato e produção de pigmento através da proposição de uma modelagem cinética do bioprocesso e do ajuste de parâmetros.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PIGMENTO *VERSUS* TINTURAS (*DYES*)

O emprego de corantes nos mais diversos materiais têm como finalidade conferir ou realçar as cores, empregar identidade ao produto, proteger as propriedades de determinados substratos ou simplesmente com propósitos decorativos (ABDEL GHANY, 2015; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Diante da variedade de materiais para aplicação, bem como, dos processos de coloração empregados desde os primórdios, os corantes podem ser subdivididos em duas classes, as quais se distinguem essencialmente com base em suas solubilidades e suas características de coloração, sendo elas as tinturas (*dyes*, em inglês) e os pigmentos (HERBEST E HUNGER, 2004).

As tinturas são caracterizadas por serem substâncias coloridas solúveis, que durante o processo de coloração apresentam afinidade com o substrato aos quais são aplicadas, o que resulta na sua dispersão a nível molecular e na perda de suas características estruturais e cristalinas, conferindo cor aos materiais simplesmente pela absorção seletiva de luz (BONDIOLII; MANFREDINI E OLIVEIRA, 1998; CHRISTIE, 2001; GÜRSES et al., 2016; HAKEIM; ARAFA E ABDOU, 2015).

Por outro lado, os pigmentos, caracterizados por serem particulados sólidos orgânicos ou inorgânicos, branco, preto, coloridos ou fluorescentes, apresentam baixa solubilidade, sendo, portanto, praticamente insolúveis aos materiais aos quais são empregados. Devido a esta característica, os pigmentos são incorporados por meio de sistemas aglutinantes, nas quais suas partículas são aplicadas sobre diversos substratos por um processo de dispersão mecânica, sem que haja interação química ou física com os mesmos a serem coloridos, mantendo-se portanto, como partículas sólidas e conferindo coloração via absorção seletiva e/ou dispersão de luz (BONDIOLII; MANFREDINI E OLIVEIRA, 1998; CHRISTIE, 2001; GÜRSES et al., 2016; HAKEIM; ARAFA E ABDOU, 2015).

Diante das diferenças abordadas quanto às propriedades de solubilidade e de expressão de coloração, bem como do fato de ambas classes apresentarem a mesma finalidade básica de conferir cor a diversos materiais, tem-se que para se obter um processo de coloração eficiente, uma análise dos substratos aos quais serão aplicados se faz necessária e de extrema importância, visto que a depender do tipo de material, uma das classes apresentará mais vantagens de aplicação em virtude de suas propriedades (HERBEST E HUNGER, 2004; RAO;

XIAO E LI, 2017).

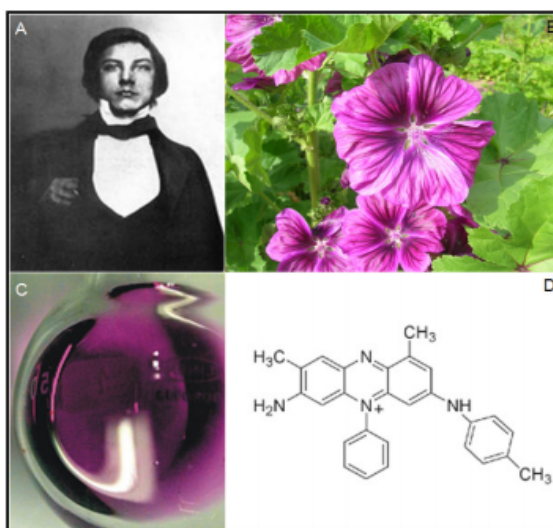
Sendo assim, a combinação entre as propriedades de cada classe de corantes e o perfil do substrato a ser colorido tende a resultar em um processo de coloração satisfatório e eficaz.

3.2 HISTÓRICO

O uso de pigmentos como corantes data de muito tempo na história humana, na qual desde o período Paleolítico já haviam indícios da utilização de pigmentos como ocre, hematita, minério de ferro e outros pigmentos à base de minerais, na confecção das pinturas rupestres (CHRISTIE, 2001; RAO; XIAO E LI, 2017). Com o decorrer do tempo e do desenvolvimento humano e tecnológico, a aplicação e a demanda por pigmentos tornaram-se cada vez mais expressivas. Até meados do século XIX, os corantes eram essencialmente obtidos via fontes animais, vegetais ou minerais (HILL, 1997). Devido a intensa e elevada demanda fez-se necessário o desenvolvimento e estudo de técnicas que sintetizassem pigmentos de forma fácil, rápida, econômica e com elevada estabilidade, de modo a serem aplicados nos mais diversos materiais tais como tecidos, cerâmicas, plásticos, papéis, cosméticos, fármacos, alimentos, entre outros.

Por volta de 1856, William Henry Perkin, um químico inglês, sintetizou a mauveína (anilina roxa) (Figura 3.1), o primeiro corante sintético que se tem relato (CONSTANT; STRINGHETA E SANDI, 2002; DUFOSSE et al., 2014). Desde então, iniciou-se uma tendência de desenvolvimento de inúmeros corantes, sintéticos e naturais, que foram lançados no mercado sem qualquer controle ou monitoramento de modo a atender os mais diversos setores industriais (MAPARI et al., 2005; PRADO E GODOY, 2003).

Figura 3.1 - William Henry Perkin (A), nome inspirado na flor de malva (B), o corante (C) e a molécula de mauveína (D).



Fonte: Adaptado de BARROS E BARROS (2010).

O uso indiscriminado e cumulativo de uma variedade de corantes, juntamente com um nível de periculosidade apresentado por alguns destes, culminou no início do século XX no desenvolvimento global de legislações para o controle do uso de corantes (BARROWS; LIPMAN E BAILEY, 2003; SCOTTER, 2015; WROLSTAD E CULVER, 2012).

A partir de então, a regulamentação quanto a aplicação de corantes tornou-se presente e obrigatória nos países do mundo inteiro, de modo que as leis, passíveis de revisão, são aplicadas até os dias de hoje com o intuito de garantir o uso seguro e consciente dos corantes, sejam eles sintéticos ou naturais, nos mais variados tipos de materiais (SCOTTER, 2015).

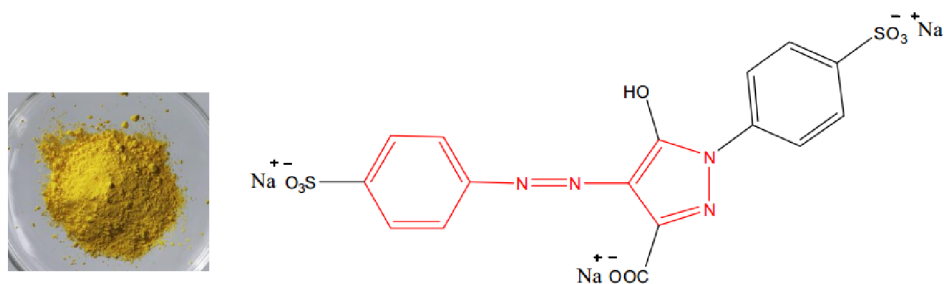
3.3 CORANTES SINTÉTICOS *VERSUS* NATURAIS

Após a síntese da mauveína em 1856 associado ao período de desenvolvimento humano e tecnológico, o uso de corantes se intensificou e os corantes sintéticos obtidos via síntese química começaram a ganhar mais espaço e serem, portanto, mais empregados em comparação aos pigmentos naturais. Essa substituição se deu principalmente devido ao fato de serem de fácil e rápido processamento, bem como por apresentarem uma elevada estabilidade e poder tintorial, um baixo custo de produção em relação aos corantes naturais tradicionais e, sobretudo, por serem pigmentos sintetizados a partir de modificações químicas, que garantem a manutenção da homogeneidade da composição e de sua qualidade (GONZÁLEZ, 2012; MORITZ, 2005; SCOTTER, 2015).

De modo geral, os corantes sintéticos podem ser classificados em 4 grupos principais, sendo eles:

- **Grupo Azo:** são caracterizados por apresentarem na sua estrutura molecular o grupo azo (-N=N-), tipicamente ligando dois sistemas aromáticos. A maioria dos corantes utilizados como aditivos alimentícios pertencem a esta classe e dentre os mais utilizados estão o Amaranço, Amarelo Crepúsculo, Vermelho 40, Azorrubina, Tartrazina (Figura 3.2) e Ponceau 4R (SCOTTER, 2015).

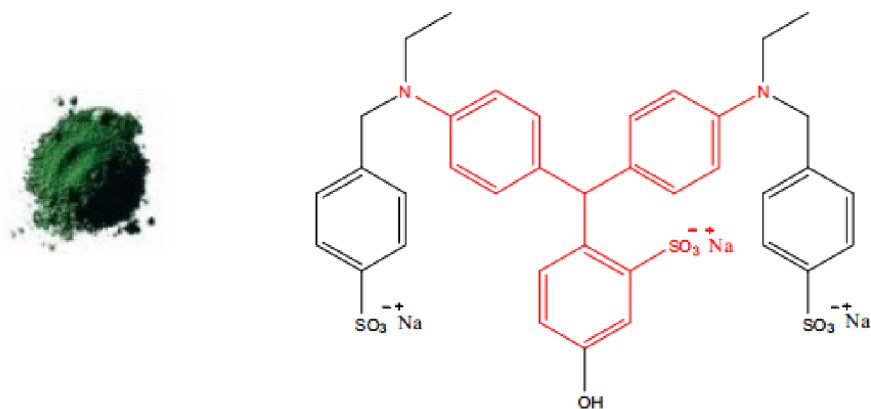
Figura 3.2- Material e a estrutura química do corante Tartrazina.



Fonte: BARROS E BARROS (2010).

- **Grupo Trifenilmetano:** Este grupo apresenta como característica a presença de um sistema de três anéis aromáticos ligados a um carbono central. Dentre os corantes deste grupo destacam-se o azul brilhante, azul patente V e o verde rápido FCF (Figura 3.3) (BARROS E BARROS, 2010).

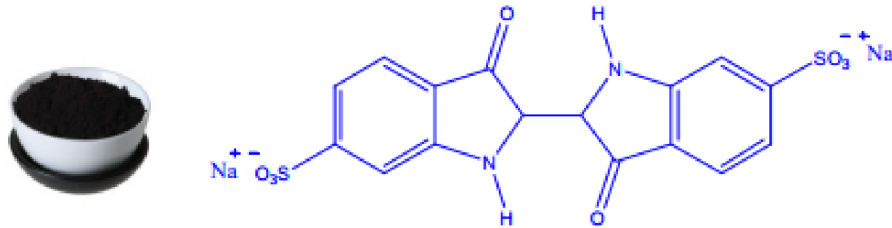
Figura 3.3- Material e estrutura molecular do corante Verde Rápido FCF.



Fonte: BARROS E BARROS (2010).

- **Grupo Indigóide:** Representado principalmente pelo corante Carmim de Índigo/Azul de Indigotina (Figura 3.4), este corante apresenta baixa estabilidade à luz, calor e acidez e possui também uma baixa estabilidade a oxidação (PRADO E GODOY, 2003).

Figura 3.4- Material e estrutura molecular do corante Carmim de Índigo/ Azul de Indigotina.



Fonte: BARROS E BARROS (2010).

- **Grupo Xanteno:** Representado principalmente pelo corante Eritrosina (Figura 3.5), caracterizado por apresentar uma variação de coloração que vai do rosa ao vermelho a depender do material aplicado (BARROS E BARROS, 2010).

Figura 3.5- Materiais e estrutura molecular do corante Eritrosina.



Fonte: BARROS E BARROS (2010).

Embora os corantes sintéticos apresentem múltiplas vantagens, com o decorrer do tempo fez-se necessário o controle de suas aplicações, visto que seu uso excessivo e indiscriminado começou a ser associado com problemas causados a saúde humana e ao meio ambiente.

Sob um rígido monitoramento, os corantes sintéticos passaram a ser estudados e submetidos a análises toxicológicas, no qual muitos apresentaram possíveis efeitos tóxicos, incluindo mutagenicidade e potencial carcinogênico. Juntamente a isto, a tendência atual da sociedade em optar por produtos mais saudáveis e menos agressivos ao meio ambiente foram

revitalizando o interesse tanto das indústrias quanto dos próprios consumidores pela utilização e consumo de pigmentos oriundos de fontes naturais (OGBONNA, 2016; PRADO E GODOY, 2003).

Os pigmentos naturais são caracterizados por serem obtidos de plantas (folhas, flores e fruto), animais (insetos e moluscos) e microrganismos (leveduras, fungos, bactérias e microalgas). Entre as vantagens no uso de pigmentos naturais estão a segurança, a baixa ou praticamente ausência de efeitos colaterais associados a toxicidade e principalmente a capacidade que alguns pigmentos naturais apresentam de agregar benefícios funcionais devido as bioatividades apresentadas por muitas destas moléculas, como é o caso dos β -carotenos, que enriquecem os alimentos com a atividade pró-vitáminica A, fortalecem o sistema imunológico e diminuem a suscetibilidade a doenças degenerativas (CAROCHO et al., 2014; DIAS; FERREIRA E BARREIRO, 2015; MENDONÇA, 2011; NIIZU, 2003).

Os corantes naturais podem ser classificados em 5 grupos principais, sendo eles: tetrapirrol, tetraterpeno ou carotenoides, flavonoides, betalaína e quinonas, como mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3. 1- Classificação e exemplos de pigmentos naturais.

Grupos	Exemplo de Pigmentos	Coloração
Tetrapirrol	Clorofila	Verde
Tetraterpeno/ Carotenoides	β -carotenos Urucum	Amarelo Amarelo/Vermelho
Flavonóides (antocianinas)	Luteolina Cianidina	Amarelo Vermelho
Betalaína	Betanina	Vermelho
Quinonas	Ácido carmínico	Vermelho

Fonte: Adaptado de MENDONÇA (2011).

- **Grupo dos Tetrapirróis**: apresentam em seu núcleo a presença e o estado de oxidação de um íon metálico importante no componente cromóforo. Estes compostos têm em sua estrutura anéis pirrólicos em disposições lineares ou cíclicas. Além da clorofila, pertencem a esta classe o grupo Heme (sangue) e o grupo Bile (algas e cianobactérias) (SOUZA, 2012).
- **Grupo dos Tetraterpenos/Carotenoides**: representados pelos pigmentos carotenoides e xantofilas que podem ser produzidos por plantas, bactérias e fungos, estes pigmentos podem conferir diversos benefícios funcionais (SCHIOZER; BARATA, 2007).

- **Grupo dos Flavonóides:** composto pelos pigmentos flavonoides e antocianinas, estes são encontrados principalmente em fontes vegetais. As antocianinas, pigmentos presentes nas flores, frutos e folhas, apresentam uma faixa de coloração bem diferenciado variando de laranja a azul, a depender do pH do meio onde se encontram. Já os pigmentos flavonoides são caracterizados por apresentar baixo poder de tingimento (GOMES, 2012; LOPES et al., 2007; SOUZA, 2012).
- **Grupo das Betalaína:** caracterizada por apresentar pigmentos nitrogenados (amarelo, vermelho ou púrpura), estes estão presentes em raízes, folhas, flores e frutos e em algumas espécies de fungos. Além disso, também estão relacionadas com o pigmento animal da melanina, as eumelaninas, que tem como função principal proteger a pele humana dos raios ultravioletas. Inclui-se também nesta classe betacianinas e as betaxantinas (SCHIOZER E BARATA, 2007).
- **Grupo Quinonas:** Representadas pelas benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, este é o maior grupo em número e variação estrutural. Seu principal representante como corante alimentício é o carmin de cochonilha (ALVES, 2005; MORITZ, 2005).

Atualmente, alguns pigmentos naturais de origem animal e vegetal, tais como a curcumina, o extrato de urucum, o carmin de cochonilha; além de alguns pigmentos de origem fúngica como o Arpink red™, o licopeno, o pigmento *Monascus* e o β -caroteno, já vêm sendo empregados nos mais diferentes setores industriais (DUFOSSE et al., 2014; MAPARI et al., 2005).

Entretanto, ainda que os corantes naturais sejam relativamente mais seguros ao homem e a natureza, os oriundos de plantas e animais apresentam algumas limitações como a sensibilidade ao calor, a luz, ao oxigênio e a variação de pH. Além disso, no caso dos pigmentos provenientes de plantas, existe ainda a desvantagem da possível ocorrência de variação do perfil químico de um lote para outro e da dependência de fatores climáticos e de amplo espaço físico, que podem resultar em uma produção sazonal de alguns pigmentos (GUNASEKARAN E POORNIAMMAL, 2008; MAPARI et al., 2009, 2005).

Diante deste contexto, embora os corantes naturais apresentem algumas desvantagens relacionadas à estabilidade e ao custo de produção, estes são mais seguros e menos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente frente aos corantes sintéticos. Associada a isto, a tendência da sociedade em relação ao consumo de produtos naturais vem acarretando em

uma substituição gradativa dos pigmentos sintéticos pelos naturais e, simultaneamente, vem estimulando cada vez mais as indústrias e a comunidade acadêmica, a explorar novos meios e fontes de produção biotecnológicas de pigmentos naturais, com o intuito de superar as limitações tecnológicas ainda existentes (CONSTANT; STRINGHETA E SANDI, 2002; MAPARI et al., 2005; OGBONNA, 2016).

3.4 FUNGOS FILAMENTOSOS COMO FONTE DE PIGMENTOS NATURAIS

A busca por suprir e melhorar os processos de obtenção de pigmentos naturais vem se tornando cada vez mais frequente e expressiva, devido ao aumento global na fabricação de diversos tipos de materiais e da exigência dos consumidores por produtos mais saudáveis e menos agressivos ao meio ambiente (DOWNHAM E COLLINS, 2000).

Uma das tecnologias que vem se destacando e sendo bastante explorada pelas indústrias e pela sociedade acadêmica é a produção de pigmentos por via microbiana. Esta tem se destacado, pois além do fato de os microrganismos crescerem rapidamente e possuírem uma alta produtividade, seus pigmentos, principalmente os gerados por fungos filamentosos, na sua grande maioria apresentam maior estabilidade em diferentes pHs e temperaturas, além do fato de sintetizarem uma vasta gama de cores (DUFOSSE et al., 2014; MAPARI et al., 2005).

Sendo assim, esta tecnologia, embora já expresse resultados significativos, ainda tem muito a ser explorada, visto que a alta produtividade e a relativa estabilidade de muitos pigmentos microbianos são aspectos importantes para que as indústrias possam empregá-los como substitutos dos corantes sintéticos.

Dentre os diversos tipos de microrganismos existentes, os fungos filamentosos estão sendo investigados como fontes prontamente disponíveis para produção de diversos pigmentos naturais (DUFOSSE et al., 2014). O interesse por esta fonte é resultado principalmente das características de crescimento e produção de pigmentos apresentadas por diversas espécies fúngicas.

3.4.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são caracterizados por possuírem como elemento constituinte básico hifas, septadas ou não, cujo conjunto é denominado micélio. A partir das hifas são formados esporos que servem para propagação das espécies fúngicas (ANVISA, 2004).

No que se diz respeito a produção de metabólitos, devido ao seu potencial bioquímico e a sua facilidade a se adaptar a condições extremas de cultivo, muitas espécies de fungos filamentosos são consideradas bons produtores de metabólitos como antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos e pigmentos (HAJJAJ et al., 2000). Estes apresentam diferentes aplicações em variados setores industriais desde o setor alimentício até o setor têxtil.

Diversos ramos industriais vêm investindo em pesquisas e tecnologias de cultivo de fungos filamentosos para obtenção de metabólitos secundários, devido ao seu elevado potencial bioquímico e suas características, dentre as quais se destacam:

- i) fácil e rápido crescimento que pode ocorrer em meios de cultivo de baixo custo e independente de condições climáticas (DUFOSSÉ, 2009; MAPARI et al., 2005);
- ii) requerimento de pouco espaço para produção (MENDONÇA, 2011);
- iii) capacidade de produzir um extenso leque de opções de metabólitos secundários como antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, bem como, os pigmentos (BERDY, 2005; OGBONNA, 2016; RAO; XIAO E LI, 2017);
- iv) capacidade que diversas espécies apresentam de produzir uma vasta gama de pigmentos que variam desde sua coloração e de classes químicas que constituem sua estrutura molecular (DUFOSSÉ et al., 2014; MAPARI et al., 2005).

Diante destas características e das exigências do mercado global em buscar produtos naturais e mais saudáveis, o cultivo de fungos filamentosos tem tornado uma promissora ferramenta para obtenção de metabólitos aplicáveis nas indústrias, entre eles os pigmentos naturais.

A utilização de fungos filamentosos como fonte natural de pigmentos aplicados especialmente como corantes alimentícios data de antes de 1884, quando o botânico francês Tieghem caracterizou o fungo *Monascus* (OGBONNA, 2016; VAN TIEGHEM, 1884). Desde então, o número de pesquisas para obtenção de pigmentos naturais via cultivo de fungos filamentosos aplicáveis principalmente ao setor alimentício tem crescido, uma vez que a biodiversidade das espécies fúngicas é muito ampla, o que favorece e ainda requer muitos estudos de modo a melhorar os processos já existentes ou até mesmo obter novos pigmentos.

Como mencionado, o gênero *Monascus* foi um dos primeiros fungos filamentosos a serem estudados para obtenção de pigmento natural. Entretanto, devido à grande biodiversidade dos fungos filamentosos, atualmente outros gêneros vêm sendo estudados e já

utilizados como potenciais produtores de pigmentos naturais, dentre eles destacam-se os gêneros *Monascus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Talaromyces* e *Paecilomyces*, como mostra a Tabela 3.2 (OGBONNA, 2016; RAO; XIAO E LI, 2017).

Tabela 3.2- Algumas espécies fúngicas produtoras de pigmentos.

Espécie Fúngica	Coloração dos pigmentos gerados/ classe
<i>Monascus purpureus</i> strain FTC 5391	Vermelho
<i>Monascus pilosus</i> strain C1.	Amarelo e Vermelho
<i>Monascus purpureus</i> CMU001	Vermelho
<i>Monascus ruber</i>	Vermelho
<i>Monascus.</i>	Vermelho
<i>Monascus purpureus</i> CCT3802	Vermelho e micotoxina citrinina
<i>Monascus purpureus</i> atcc 36928	Vermelho
<i>Monascus purpureus</i>	Vermelho e Amarelo
<i>Monascus purpureus</i> strain FTC 5391	Vermelho
<i>Monascus</i> mutante	Amarelo
<i>Monascus purpureus</i> 192F	Monascina, ankaflavina, rubropunctatina, monascorubrina e monascorubramina
<i>Penicillium aculeatum</i> ATCC 10409	Amarelo
<i>Penicillium purpurogenum</i> DPUA 1275	Vermelho
<i>Penicillium</i> sp.	Vermelho
<i>Penicillium</i> sp (DLR-7)	Vermelho
<i>Talaromyces amestolkiae</i> GT11	Amarelo e Vermelho
<i>Talaromyces astroroseus</i>	Vermelho
<i>Talaromyces purpurogenus</i>	Vermelho, Laranja e Amarelo
<i>Fusarium aquaeductuum</i>	Carotenoide
<i>Fusarium bulbigenium</i>	Nafitaquinona
<i>Fusarium decemcellulare</i> F.-1179	Nafitaquinona
<i>Aspergillus flavus</i>	Pigmentos (diversos)
<i>Aspergillus niger</i>	Pigmentos (diversos)
<i>Paecilomyces</i> sp.	Pigmentos (diversos)

Fonte: Adaptado de OGBONNA (2016)

Conforme apresentado na Tabela 3.2, muitas espécies são capazes de sintetizar pigmentos de várias cores. Associado a isto, pode-se observar que diferentes espécies são capazes de gerar a mesma coloração, evidenciando assim que o tipo ou a cor de um pigmento fúngico não é específico de cada espécie, ou seja, muitas espécies são capazes de produzir a mesma cor assim como uma única espécie é capaz de sintetizar simultaneamente diferentes pigmentos sob a mesma condição de cultura. Além disso, em termos de natureza química, diversos pigmentos já são conhecidos, porém como a descoberta e sintetização de novos pigmentos vem ocorrendo de forma ágil e contínua, muitos desses ainda não possuem sua classificação bem definida (OGBONNA, 2016).

Outro ponto é que embora os fungos sejam potenciais fontes naturais para a produção de diferentes metabólitos secundários com possíveis aplicações industriais, estes também requerem e são submetidos a uma rígida vigilância através de diversos testes toxicológicos, visto que alguns metabólitos secundários são produzidos simultaneamente com outras micotoxinas como por exemplo a citrinina, uma micotoxina com propriedades nefrotóxicas e hepatotóxicas, a qual é produzida juntamente com pigmentos por algumas espécies de fungos do gênero *Monascus* (DUFOSSÉ, 2006; MAPARI et al., 2009).

Sendo assim, o monitoramento dos metabólitos gerados pelos fungos filamentosos se faz necessário de modo a evitar possíveis efeitos colaterais aos seres humanos e impacto ao meio ambiente. Além disso, contribuem para que novas metodologias e tecnologias sejam desenvolvidas de modo a controlar e minimizar a coprodução e os efeitos causados por estas micotoxinas e, simultaneamente, aprimorar e investigar novos potenciais produtores de pigmentos naturais.

3.4.2 *Metabólitos primários e secundários*

Uma alternativa para se obter novas metodologias e tecnologias de síntese e extração de pigmentos naturais a partir de fungos filamentosos é ter conhecimento de como estes pigmentos são gerados pelos fungos, ou seja, a partir do estudo da rota metabólica de fungos filamentosos tem-se a possibilidade, por meio da utilização de engenharia genética e de outras tecnologias, de se aprimorar a produção e a qualidade dos metabólitos naturais já conhecidos, ou até mesmo de descobrir novos produtos com potencial de uso nas indústrias.

Entretanto, o efetivo conhecimento das rotas metabólicas dos fungos filamentosos para produção de metabólitos naturais, principalmente os pigmentos, são rotas complexas e ainda não bem compreendidas pelas indústrias e pela sociedade acadêmica (CALVO et al., 2002; MAPARI et al., 2009).

Segundo alguns estudos já realizados, acredita-se que durante a fase logarítmica de crescimento dos fungos filamentosos são produzidos metabólitos essenciais ao crescimento das células que incluem aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos e outros, sendo estes designados como produtos do metabolismo primário. Após atingirem as fases de desaceleração e estacionária, algumas espécies de fungos filamentosos tendem a produzir os denominados metabólitos secundários. Além disso, o que se denomina por metabólitos secundários podem ser ainda uma conversão microbiana de um metabólito primário ou até mesmo algum composto presente no meio original de crescimento, que o

microrganismo produz somente depois que um número considerável de células e metabólitos primários tenham sido acumulados (DEMAIN, 1986; SÁ, 2007).

Dentre os metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos destacam-se antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos e pigmentos. Vale ressaltar que nem todas espécies de fungos filamentosos são capazes de sintetizar metabólitos secundários. Entretanto, das que sintetizam, muitas espécies são capazes de produzir mais de um tipo de metabólito secundário, sendo a maioria destes derivados de peptídeos não-ribossômicos (NRP) ou de poliquetídeos (BRAKHAGE, 2013; CALVO et al., 2002; DEMAIN, 1986).

Em geral os metabólitos secundários são caracterizados por apresentarem moléculas complexas, com grande diversidade química estrutural e baixa massa molar. Um dos possíveis fatores que definem um produto como metabólito secundário é o fato deste não ser essencial para o crescimento do organismo produtor, ou seja, durante a fase exponencial de crescimento dos fungos filamentosos, na qual a velocidade de crescimento destes microrganismos é elevada, a expressão dos genes que codificam os denominados metabólitos secundários acabam não ocorrendo, ou seja, a síntese de metabólito secundário durante este período é possivelmente reprimida (BRAKHAGE, 2013; CALVO et al., 2002; DEMAIN, 1986).

Diante do exposto, embora a importância dos metabólitos secundários no crescimento celular do organismo produtor seja ainda alvo de consideráveis debates, sua aplicação e seus resultados nas indústrias são notáveis. Porém, devido à complexidade da produção destes metabólitos, ainda se faz necessário a realização de diversas pesquisas e estudos sobre a forma de produção destes metabólitos e as interações entre as condições do meio e o microrganismo, com o intuito de desenvolver e aprimorar métodos e tecnologias de cultivo para a produção e extração de produtos secundários, bem como explorar as potencialidades dos fungos filamentosos, principalmente no que diz respeito à produção de pigmentos naturais (SÁ, 2007).

3.4.3 *Gênero Talaromyces/Penicillium*

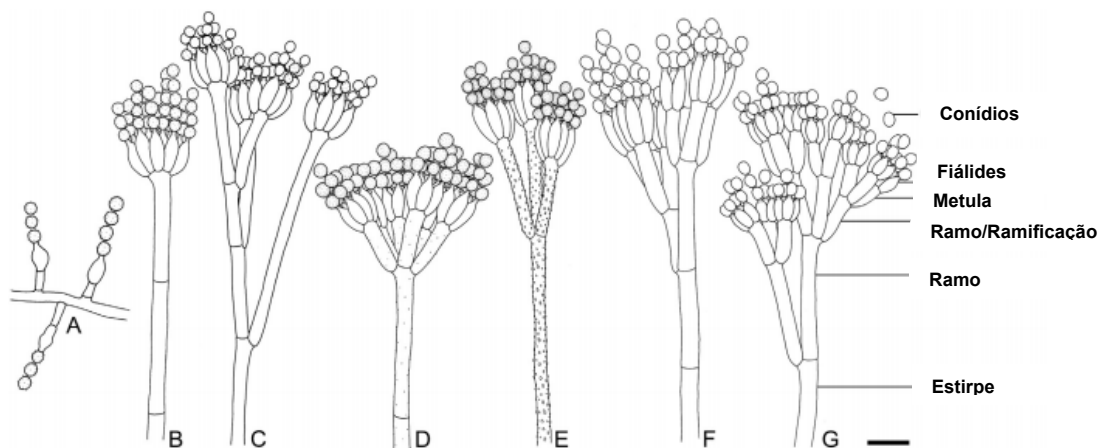
Em meio a grande variedade de espécies fúngicas produtoras de metabólitos secundários, os fungos do gênero *Penicillium* têm se destacado quanto à produção de diversificados tipos de metabólitos secundários ativos, incluindo substâncias antibacterianas, antifúngicas, imunossupressores e até mesmo pigmentos naturais (GEWEELY, 2011; KUMAR

et al., 2015; MÉNDEZ-ZAVALA et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2012).

O gênero *Penicillium* foi descrito pela primeira vez por Heinrich Friedrich Link em 1809. Este gênero, além de sintetizar uma vasta variedade de metabólitos secundários, é caracterizado por possuir um rápido crescimento celular utilizando geralmente uma ampla diversidade de monossacarídeos, dissacarídeos, álcoois e ácidos como única fonte de carbono. Além disso, apresentam uma alta tolerância a variações de propriedades físico-químicas do meio, como pH e temperatura, o que lhe confere a capacidade de crescer em quaisquer ambientes que lhe proporcionem desde o mínimo de sais minerais até as mais complexas fontes de carbono (PEBERDY, 1987).

Em termos de morfologia e reprodução, o *Penicillium* é um dos diversos gêneros de fungos que se reproduzem através da produção de esporos denominados de conídios, que são originados a partir de estruturas designadas conidióforos ou esporóforos, nas quais a depender das espécies de *Penicillium*, estas estruturas apresentarão diferentes configurações, conforme ilustra a Figura 3.6 (VISAGIE et al., 2014).

Figura 3.6- – Micromorfologia de fungos filamentosos do gênero *Penicillium* - A: Conidióforos com fiálides solitárias; B: Monoverticilado; C: Divaricato; D e E: Biverticilado; F: Terverticilado; G: Poliverticilado.



Fonte: Adaptado de VISAGIE et al. (2014).

Entretanto, devido a sua elevada diversidade e complexa morfologia, diversos esquemas taxonômicos têm sido propostos para a delimitação de espécies dentro deste gênero. Porém, a monografia de Raper e Thom (1949) relacionada com o gênero *Penicillium* ainda é considerada a referência-base na taxonomia deste gênero (FRISVAD, 2015; FRISVAD E SAMSON, 2004).

Por volta de 1955, vários autores sugeriram usar nomes para o estado sexual dos *Aspergilli* e *Penicillia*, sempre que possível, utilizando o termo “anamorfo” para os estados assexuados, e o termo “teleomorfo” para o estado sexuado (FRISVAD, 2015).

Por esta razão, em meados de 1980 a monografia de Pitt propôs a divisão do gênero *Penicillium* em quatro subgêneros, sendo eles *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Penicillium* e *Biverticillium*, levando como base a morfologia e o padrão de ramificação dos conidióforos. Porém, a identificação de espécies de *Penicillium* baseadas apenas em critérios morfológicos mostrou-se uma tarefa difícil, principalmente devido à alta similaridade e sobreposição de micromorfologias das diferentes espécies. Com os recentes avanços na biologia molecular, a taxonomia de *Penicillium* e gêneros aliados tem sido amplamente influenciada pelos dados contidos na sequência do DNA (FRISVAD, 2015; KHODAEI et al., 2015).

Sendo assim, novos esquemas taxonômicos continuaram a ser desenvolvidos no decorrer dos anos. Em 2010 sugeriu-se a introdução de um novo sistema nomenclatural no qual um fungo filamentosos teria apenas um nome. Esta sugestão foi adotada pelo Congresso Botânico em Melbourne e, então, toda e qualquer espécie fúngica passou a ter apenas um nome oficial. Como resultado deste novo sistema “um fungo-um nome”, o gênero *Talaromyces* foi designado para compreender todas as espécies do subgênero *Biverticillium*, enquanto que o nome *Penicillium* foi conservado sensu stricto para espécies pertencentes aos subgêneros *Aspergilloides*, *Furcatum* e *Penicillium* e para os seus teleomorfos *Eupenicillium* (FRISVAD, 2015; NICOLETTI E TRINCONE, 2016).

Em virtude do esquema taxinômico proposto ser recente, algumas espécies de fungos filamentosos ainda vêm sendo reportadas como *Talaromyces/Penicillium*, como é o caso do fungo *Talaromyces minioluteus/Penicillium minioluteum*, uma espécie variante anamorfa do gênero *Penicillium*, que tem se destacado principalmente quanto à produção de dextranase, miniolin A, miniolin B e miniolin C (LARSSON et al., 2003; TANG et al., 2015), mas também vem sendo estudada pela comunidade acadêmica como uma promissora espécie produtora dos denominados biocorantes.

3.4.4 Metabólitos sintetizados por fungos filamentosos

O emprego de pigmentos naturais provenientes de fungos filamentosos em substituição aos corantes sintéticos pelas indústrias nos mais diversos setores vem crescendo continuamente. Em grande parte, essa significativa substituição é resultado da conscientização

global dos consumidores em optar por produtos mais saudáveis e menos agressivos ao meio ambiente.

Em termos gerais, pigmentos naturais sintetizados por fungos filamentosos, alguns listados na Tabela 3.3, são caracterizados por apresentarem aspectos naturais e seguros, além de alguns apresentarem atividades biológicas importantes como antibacteriano, antifúngico, antimicrobianos, antioxidante, anticancerígeno, antiproliferativo, imunossupressor, entre outras (GEWEELY, 2011; KUMAR et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2012).

Tabela 3.3- Alguns pigmentos naturais produzidos por fungos filamentosos.

Molécula	Coloração	Microrganismo Produtor
Licopeno	Vermelho	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
Ankaflavina	Amarelo	<i>Monascus sp.</i>
Antraquinona	Vermelho	<i>Penicillium oxalicum</i>
β -caroteno	Laranja-Amarelo	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
Rubropunctatin	Laranja	<i>Monascus sp.</i>
Monascorubramin	Vermelho	<i>Monascus sp.</i>

Fonte: Adaptado de ABDEL GHANY (2015).

Em termos de características físico-químicas, os pigmentos fúngicos, embora sejam menos estáveis ao calor, a luz, ao ar e ao pH do que os corantes sintéticos, destacam-se frente aos sintéticos por apresentarem a característica de serem em sua grande maioria menos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, embora não dispensem o monitoramento toxicológico e o controle de sua aplicação. Além disso, os pigmentos fúngicos ressaltam-se sobre os demais pigmentos naturais extraídos de plantas e animais, principalmente por exibirem uma maior estabilidade à variação de pHs e temperaturas, além do fato de apresentarem uma extensa variedade de coloração e uma ampla aplicabilidade resultante, principalmente, dos diversos grupos químicos que constituem suas estruturas moleculares, tais como carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas, entre outras (DUFOSSE et al., 2014; MAPARI et al., 2005).

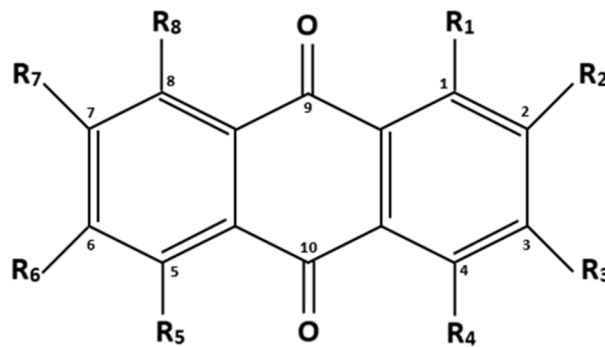
Diante destas características e do cenário comercial mundial, o emprego dos pigmentos fúngicos naturais vem se tornando cada vez mais atraente e promissor.

3.5 ANTRAQUINONAS

Dentre as diversas classes químicas capazes de compor a estrutura molecular dos pigmentos fúngicos, as antraquinonas correspondem ao maior grupo de pigmentos naturais pertencentes à família das quinonas (CARO et al., 2012; DUVAL et al., 2016; FOUILLAUD et al., 2016).

Tendo como sua estrutura base três anéis benzeno, como ilustra a Figura 3.7, a diversidade dos compostos antraquinóides está associada a natureza e a posição de seus substituintes (FOUILLAUD et al., 2016; GESSLER; EGOROVA E BELOZERSKAYA, 2013).

Figura 3.7- Estrutura geral da molécula antraquinona, sendo R1 a R8 seus substituintes laterais.



Fonte: FOUILLAUD et al. (2016).

Em virtude de sua estrutura química, bem como, de seu espectro de absorção eletrônico, as antraquinonas, além de exibirem propriedades cromáticas interessantes que resultam em uma ampla gama de cores, muitas apresentam diversas propriedades bioativas, incluindo atividades laxativa, anti-inflamatória, anti-fibrótica, antitumoral, bacteriostática, fungicida, antiviral, herbicida e inseticida (FOUILLAUD et al., 2016; GESSLER; EGOROVA E BELOZERSKAYA, 2013).

De modo geral, os fungos filamentosos, principalmente os endofíticos, têm se destacado como uma das potenciais fontes produtoras de metabólitos secundários derivados de antraquinonas, como é o caso de alguns biocorantes (HUANG et al., 2007; XU et al., 2008).

Em virtude disto, cada vez mais estudos e pesquisas vêm sendo desenvolvidos com o intuito de otimizar o processo de biossíntese destes compostos através do controle de fatores que regulam e influenciam à produção de pigmentos por fungos filamentosos, tais como pH,

temperatura, fontes de nutrientes, condições de agitação e aeração do processo e modo de cultivo (FOUILLAUD et al., 2016; FRISVAD; ANDERSEN E THRANE, 2008; MÉNDEZ et al., 2011; NIELSEN E SMEDSGAARD, 2003; OGBONNA, 2016).

3.6 FATORES QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS FÚNGICOS

O processo de produção de pigmentos naturais por fungos filamentosos pode ser afetado por fatores operacionais e nutricionais, o que a depender da espécie pode contribuir para a síntese de diversos pigmentos, visto que diante das condições de processo este apresentará um determinado comportamento (JOSHI et al., 2003; MIYAKE et al., 2008).

Durante muito tempo, a produção de pigmentos por um fungo filamentoso era utilizada apenas como ferramenta taxonômica para identificação e diferenciação entre espécies fúngicas, não havendo estudos voltados para a potencial aplicação e utilização destes pigmentos. Entretanto, com o desenvolvimento global e as exigências comerciais e sociais, diversas pesquisas e estudos começaram a ser desenvolvidos sobre a potencialidade de aplicação industrial e comercialização dos pigmentos fúngicos naturais (MAPARI et al., 2005; PITT et al., 1979).

Através do desenvolvimento de diversas pesquisas pôde-se avaliar que além de fatores biológicos, alguns fatores físico-químicos do processo fermentativo utilizando fungos filamentosos influenciam no crescimento celular, bem como nas características dos pigmentos naturais sintetizados e na produtividade do processo.

Em termos biológicos, a potencialidade de uma espécie fúngica relacionada com a síntese de pigmentos naturais pode ser avaliada através da utilização de ferramentas quimiotaxonômicas, que consistem em programas computacionais de rastreamento de alto desempenho. Estes permitem, a partir dos perfis dos metabólitos de uma espécie, selecionar, de uma maneira rápida e eficiente, produtores de pigmentos potencialmente seguros dentro de uma vasta diversidade bioquímica de fungos filamentosos, baseando-se em informações como nicho ecológico, perfis dos metabólitos específicos da espécie e nas condições ótimas de crescimento e do meio de cultivo para a sintetização dos metabólitos secundários (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003).

Dentre os fatores físico-químicos de um dado bioprocessamento, destacam-se:

- **Composição do meio de cultivo**

Um dos fatores que contribuem no crescimento celular e na produtividade de pigmento natural sintetizado por fungos filamentosos é o tipo e a concentração de nutrientes, principalmente carbono e nitrogênio.

Com relação às fontes de carbono, glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose e lactose são consideradas as principais fontes de obtenção de energia para o crescimento e produção de metabólitos por fungos filamentosos (KRAIRAK et al., 2000; REYNDERS; RAWLINGS E HARRISON, 1996).

Fungos filamentosos são capazes de metabolizar diversos tipos de fontes de carboidratos, desde as mais simples às mais complexas, podendo a fonte ótima ser diferente a depender da finalidade do microrganismo ou até mesmo variar entre a mesma espécie.

Por exemplo, “Potato Dextrose Broth” (PDB) foi reportado por CHINTAPENTA et al. (2014) como o melhor meio de cultura para a espécie *Penicillium* DLR-7, enquanto que a sacarose, segundo SANTOS-EBINUMA (2013) se mostrou uma fonte favorável à produção de pigmento vermelho pela espécie *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275.

Outro exemplo é o caso das espécies *Monascus*. MEINICKE et al. (2012) avaliaram o efeito do glicerol sobre a produção de pigmento vermelho pela espécie *Monascus ruber* CCT 3802 e obtiveram valores máximos de produção próximos a 7,38 UA (unidades de absorvância). Enquanto que DA COSTA E VENDRUSCOLO (2017), ao utilizarem lactose hidrolisada como única fonte de carbono, obtiveram uma produção de pigmento vermelho pela espécie *Monascus ruber* CCT 3802 de aproximadamente 7,58 UA.

NIMNOI E LUMYONG (2011) observaram que o meio de cultura “Potato Dextrose Broth” (PDB) foi o melhor para produção de pigmento, porém a máxima concentração celular de *Monascus purpureus* CMU 001 ocorreu no cultivo utilizando glicose como fonte de carbono.

Sendo assim, de modo geral, a fonte de carbono mais eficiente para cada espécie de fungo filamentoso deve ser definida com base na combinação de três fatores, sendo eles a espécie fúngica utilizada, as demais condições do meio de cultivo e a finalidade para qual se deseja realizar o bioprocessamento, podendo ser obtenção de biomassa ou produção de metabólitos (JOSHI et al., 2003; OGBONNA, 2016).

Em termos da fonte de nitrogênio, acredita-se que a mesma está associada a regulação da expressão de genes que podem ativar vias metabólicas importantes na produção de pigmentos. Além disso, estas fontes podem participar da estrutura química dos metabólitos produzidos, sendo, portanto, um relevante fator a ser considerado na realização de processos fermentativos utilizando fungos filamentosos com intuito de obter pigmentos naturais.

Diversas pesquisas têm demonstrado que as fontes orgânicas de nitrogênio tendem a ser preferidas às fontes inorgânicas, tanto em relação ao crescimento celular quanto em relação aos metabólitos gerados (OGBONNA, 2016), como avaliado por OLIVEIRA; BARBIERI E EBINUMA (2017), que ao compararem diversas fontes de nitrogênio, verificaram uma elevada produção de 25,42 UA de pigmento vermelho por *Talaromyces amestolkiae* ao empregarem nitrogênio orgânico.

Logo, tem-se que a composição do meio de cultivo apresenta significativa relevância tanto no crescimento celular quanto na produção de metabólitos em culturas fúngicas, sendo que tanto as fontes de carbono quanto de nitrogênio podem se diferir a depender da finalidade do processo (CHATTERJEE E MAITY, 2009; HAJJAJ et al., 2012).

- **pH e Temperatura**

Metabolicamente, acredita-se que os efeitos do pH e da temperatura estão diretamente associados com as mudanças nas atividades das proteínas celulares, sendo o pH mais responsável pelas alterações nas atividades das enzimas envolvidas na biossíntese dos pigmentos naturais e na alteração morfológica do microrganismo produtor, enquanto que o efeito da temperatura está mais relacionado com a regulação do sistema enzimático das células fúngicas (MÉNDEZ et al., 2011).

Assim como as fontes nutricionais, os efeitos do pH e da temperatura variam de espécie para espécie. Além disso, as condições ótimas de cultivo para o crescimento da biomassa podem não ser as mesmas para a produção de metabólitos.

OROZCO E KILIKIAN (2008) observaram altas produções de pigmento vermelho por *Monascus purpureus* CCT 3802 em valores de pH próximos a 8,5, enquanto que o crescimento celular foi favorecido em valores de pH próximos a 5,5. AFSHARI et al. (2015) mostraram que valores de pH próximos

a 6,5 favoreceram a produção de pigmento amarelo por *Penicillium aculeatum* ATCC 10409, enquanto valores próximos a 8,0 contribuíram para uma alta concentração de biomassa.

De modo geral, as condições ótimas de pH e temperatura para a produção de pigmentos por diversas espécies de fungos filamentosos variam entre 2,5 a 9 em termos de pH e de 24 a 32°C em relação a temperatura (CARVALHO et al., 2005; OGBONNA, 2016).

Sendo assim, acredita-se que a alta concentração e produção de pigmentos fúngicos pode ser expressivamente influenciada pela combinação dos efeitos do pH e da temperatura na ativação de mecanismos provavelmente relacionados a controles genéticos e metabólicos (MÉNDEZ et al., 2011).

- **Tipo de cultivo**

Este fator relaciona a produção de pigmento ao estado físico do meio na qual o mesmo é sintetizado. Cultivos para síntese de pigmentos naturais podem ocorrer em meios sólidos ou serem conduzidas em meios líquidos (cultivos submersos). Alguns estudos apontam que a depender da espécie, a produção de pigmentos é melhor favorecida quando cultivada em meio sólido (JOSHI et al., 2003; MAPARI et al., 2009). Entretanto, este fator ainda é alvo de diversas discussões e de muitas pesquisas, principalmente pois, a depender da espécie fúngica, os resultados obtidos podem ou não ser favoráveis à síntese de pigmentos.

- **Aeração e agitação**

A agitação e aeração em biorreatores são fatores relevantes e de importância em cultivos conduzidos na forma submersa, pois além de melhorarem a transferência de massa no caldo, principalmente oxigênio uma vez que os fungos produtores de pigmentos são estritamente aeróbios, a agitação e aeração também contribuem para a homogeneização do caldo, prevenindo a sedimentação celular (OGBONNA, 2016).

Além disso, estudos como os de AFSHARI et al. (2015) e CHO et al. (2002a), sugerem que a concentração de oxigênio dissolvido no caldo, assim como a frequência de agitação podem afetar tanto no crescimento de biomassa quanto na síntese de pigmentos naturais por diferentes espécies fúngicas.

Outra variável importante em cultivos submersos é a viscosidade do caldo de cultivo, pois devido a morfologia dos micélios dos fungos filamentosos,

muitas vezes a viscosidade do meio se eleva, o que pode resultar em problemas como falta de homogeneização da mistura, transferência de massa de oxigênio insuficiente, exigência de alto consumo de potência na condução do processo e formação de zonas mortas no interior do biorreator. Estes fatores podem, portanto, afetar diretamente a produtividade do processo como um todo. Logo, as condições de agitação e aeração são ferramentas importantes no controle e manutenção da reologia do caldo de cultivo e, uma vez bem escolhidas, podem favorecer a sintetização de pigmentos naturais por fungos filamentosos (BLANCH E BHAVARAJU, 1976).

Diante destes fatores, verifica-se que o controle apropriado das condições operacionais em cultivos utilizando fungos filamentosos, associado com a engenharia metabólica destes microrganismos, podem levar a resultados satisfatórios em termos de crescimento celular e de produção de pigmentos naturais (MAPARI et al., 2005).

3.7 ESTRATÉGIAS DE CULTIVO PARA OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DE METABÓLITOS FÚNGICOS

Diversas estratégias de cultivo têm sido empregadas para aumentar a produção de pigmentos fúngicos em escala industrial. Atualmente, a maioria dos estudos relacionados com a produção destes pigmentos se dá através de cultivos submersos conduzidos em batelada.

CHO et al. (2002b), após otimizarem as condições de cultivo de *Paecilomyces sinclairii* em frascos agitados, obtendo produções de aproximadamente 1,12 g/L de pigmento vermelho, observaram um aumento de quase 4 vezes na produção ao conduzir o cultivo em batelada em biorreator de 5 L.

MUSAALBAKRI et al. (2006), também realizaram estudos quanto a otimização da produção de pigmento vermelho por *Monascus purpureus*, e constataram um aumento de aproximadamente 3 vezes ao realizar ensaios em batelada em biorreatores de bancada.

Outras alternativas já empregadas na produção de outros metabólitos secundários podem vir a ser estratégias eficazes na obtenção de altas produções de biocorantes, como por exemplo a condução de cultivos em batelada alimentada e a baixas temperaturas.

Uma das estratégias já consolidada no processo de produção de antibióticos e com potencial aplicação na produção de pigmentos é a execução de cultivos em batelada alimentada. Este processo é caracterizado pela alimentação de nutrientes durante o processo fermentativo sem a retirada do caldo de cultivo (SHULER E KARGI, 1992).

A limitação de nutrientes, segundo MARTIN E DEMAIN (1980), apresenta forte influência sobre o processo de síntese de metabólitos secundários, como é o caso dos pigmentos fúngicos. Sendo assim, o emprego do processo em batelada alimentada tende a favorecer a produção dos biocorantes por espécies fúngicas frente aos processos em batelada, uma vez que mantém-se restrita a oferta de nutrientes (COSTA E BADINO, 2012; FARRELL E ROSE, 1967).

Outra estratégia similar e com grande capacidade de aplicação é o uso do controle da temperatura como ferramenta de manipulação da assimilação de nutrientes pelos microrganismos.

Segundo COSTA (2014), a escolha da temperatura de operação durante um processo de bioconversão deve ser feita com muita cautela, visto que a temperatura afeta diretamente alguns parâmetros importantes do processo, ao exercer um forte efeito no crescimento, metabolismo, viabilidade celular e, em alguns casos, na degradação do produto.

Algumas pesquisas sugerem que o emprego de temperaturas mais baixas no processo fermentativo pode ser favorável à obtenção de elevados rendimentos na síntese de metabólitos secundários, visto que a partir do controle da temperatura pode-se interferir na cinética do processo, de modo que os efeitos de inibição ou repressão possam ser minimizados via velocidade de assimilação de nutrientes, o que consequentemente contribui na produção de metabólitos (COSTA E BADINO, 2012; FARRELL E ROSE, 1967).

CHO et al. (2002b), visando encontrar a temperatura mais favorável ao crescimento micelial e à produção de pigmento vermelho por *Paecilomyces sinclairii*, realizaram cultivos submersos sob várias temperaturas (15-35°C) e verificaram que a temperatura de 25°C foi a mais promissora para ambas finalidades, atingindo uma produção de pigmento vermelho de aproximadamente 4,4 g/L.

Similarmente, MÉNDEZ et al. (2011) obtiveram máxima produção de 2,46 g/L de pigmento vermelho pela espécie *Penicillium purpurogenum* a 24°C. Contudo, a concentração máxima de biomassa foi atingida a 34°C, resultados estes que se encontram de acordo com FURUKAWA E OHSUYE, (1998), que relatam que temperaturas operacionais mais baixas em cultivo tendem a resultar na redução do crescimento celular, na redução do metabolismo e na melhoria da viabilidade celular, com efeitos significativos sobre a atividade metabólica.

Recentemente, SUDHA; GUPTA E AGGARWAL (2017), um dos únicos e poucos trabalhos envolvendo a espécie fúngica *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* como produtora de pigmento vermelho, visando otimizar o bioprocessamento conduzido em Erlenmeyers, avaliaram como estratégia de cultivo a composição do meio de cultura, o pH e a

temperatura, fatores estes, como já mencionados, importantes na produção de metabólitos fúngicos. Como resultado, para cultivos conduzidos em Erlenmeyers de forma estática com duração de 20 dias utilizando o meio Saboraud, pH inicial de 5,6 e temperatura de 15°C, obtiveram uma máxima e otimizada produção de pigmento vermelho pela espécie *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* de 6,01 UA.

Sendo assim, em virtude da complexidade do processo de síntese de pigmento e da influência de fatores físico-químicos como pH, temperatura e composição do meio de cultivo sobre parâmetros cinéticos de crescimento celular, consumo de substrato, cultivos em batelada alimentada e a baixas temperaturas, embora ainda pouco estudados em relação à produção de pigmentos, mostram-se como estratégias promissoras no controle do metabolismo fúngico, visando o aumento de rendimento do cultivo, através da manipulação adequada de variáveis de processo, assim como no modo de operação dos cultivos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

Utilizou-se a linhagem *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*, um fungo filamentosso endofítico isolado da planta *Hymenaea* sp. (jatobazeiro) do Cerrado de São Carlos (SP) por ROMANO (2015), a qual se encontra armazenada na micoteca do Laboratório de Microbiologia (LaMiB) no Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da UFSCar.

4.2 TRIAGEM

Para realização do *screening* foi utilizado o meio Ágar ISP2 (International *Streptomyces* Project Medium 2) composto de 4 g/L de dextrose, 4 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de extrato de malte e 20 g/L de ágar.

Após seu preparo, o mesmo teve seu pH ajustado para 5,0 com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,4 M e foi submetido ao processo de autoclavagem a 121°C por 20 minutos, juntamente com 4 placas de Petri, 1 alça de Drigalski, 30 mL de solução salina (0,9% m/m de NaCl), 1 alça de platina, ponteiras de 20 e 1000 µL e 6 tubos de Eppendorfs de 2 mL.

Após a esterilização, realizou-se a distribuição do meio Ágar ISP2 nas placas de Petri em fluxo laminar e aguardou-se até que fosse obtido o meio solidificado. Todos os materiais esterilizados, bem como as placas de Petri já contendo o meio ágar ISP2 foram mantidos em fluxo laminar sob luz UV até que o meio sólido fosse formado.

Após a preparação das placas de Petri, com uma alça de platina retirou-se uma alíquota de esporos de um tubo de ensaio contendo a suposta linhagem *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* isolada por ROMANO (2015). Esta alíquota foi, então, submergida em um Eppendorf contendo 1ml de solução salina, o que resultou em uma solução inicial de esporos.

Desta solução, retirou-se um volume de 20µL, à qual foram misturados 980µL de água destilada, para então ser realizada a contagem de esporos em Câmara de Neubauer (MANACHINI; FORTINA E PARTINI, 1987; SANTOS-EBINUMA, 2013).

Com a média de esporos obtida pela contagem em Câmara de Neubauer, realizou-se o cálculo da concentração de esporos na solução através da equação 1 e, posteriormente, calculou-se pela equação 2 o número de diluições seriadas necessárias para, a partir da solução inicial de esporos obtida, ter-se uma solução final de esporos com concentração na ordem de

10 esporos/mL.

$$C_{ei} \left(\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right) = (Ne)_m \cdot \text{diluição} \cdot (1/V_C) \quad (1)$$

$$N_d = \text{Log}(O)_{si} - 1 \quad (2)$$

onde:

C_{ei} : concentração de esporos na solução inicial (esporos/mL).

$(Ne)_m$: número médio de esporos obtidos via contagem em Câmara de Neubauer.

$1/V_C$: inverso do volume da Câmara de Neubauer ($25 \cdot 10^4 \text{mL}^{-1}$).

N_d : número de diluições seriadas necessárias.

$(O)_{si}$: ordem da concentração de esporos na solução inicial.

Conhecido o número de diluições necessárias, foram preparados tubos Eppendorf contendo 900 μL de solução salina. No primeiro tubo Eppendorf foram adicionados 100 μL da solução inicial de esporos, resultando em uma nova solução com concentração de esporos 10 vezes menor. Desta nova solução foi retirada uma alíquota de 100 μL , a qual foi adicionada ao tubo seguinte já contendo 900 μL de solução salina, o que deu origem a uma nova solução com concentração de esporos 100 vezes menor que a da solução inicial. Esse processo foi repetido sucessivamente, conforme calculado pela equação 2, até que se atingisse uma solução final de esporos de concentração próxima a ordem de 10 esporos/mL.

Posterior a obtenção da solução final de esporos com concentração desejada, alíquotas de 1mL da mesma foram inoculadas e devidamente distribuídas sobre as placas de Petri contendo o meio sólido ágar ISP2 com a alça de Drigalski.

Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 28°C por um período de aproximadamente 10 dias, até que as colônias se formassem. Ao final deste período, por análise fenotípica, as colônias correspondentes a linhagem *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* foram identificadas e isoladas e, a partir delas preparou-se a cultura estoque de trabalho, conforme será descrito no item 4.3.

4.3 ESTOQUE DE TRABALHO

A cultura estoque de trabalho foi obtida através do preparo de tubos de ensaio, contendo cada um deles aproximadamente 40 mL de meio Ágar ISP2 (pH 5,0).

Estes, juntamente com uma alça de platina, foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. Posteriormente a este processo, os tubos foram mantidos inclinados em um fluxo laminar sob luz UV até que o meio se solidificasse.

Obtido o meio sólido ISP2, com uma alça de platina esterilizada foi raspada uma amostra de esporos da colônia de *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* formada, e a mesma foi estriada sobre o meio sólido contido nos tubos de ensaio inclinados (*slants*).

Ao final do processo os tubos foram incubados a 28°C por 10 dias e conservados em geladeira a 4°C, sendo repicados a cada 30 dias, de modo a garantir a viabilidade das culturas.

4.4 PREPARO DO INÓCULO

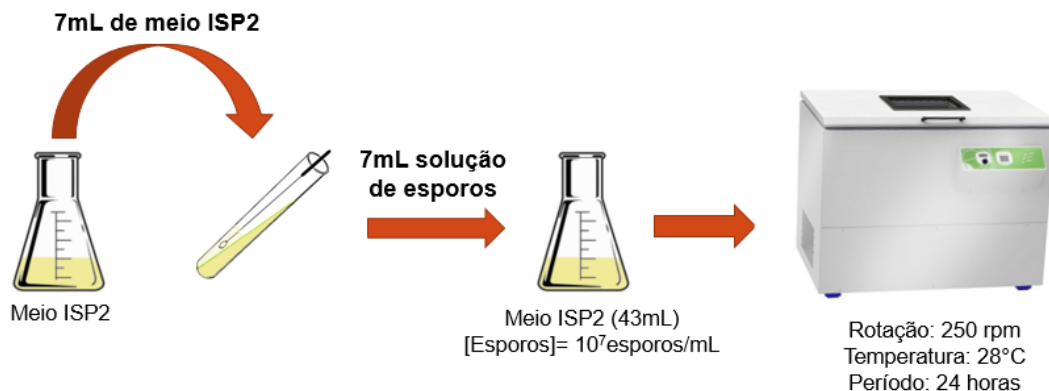
Inicialmente, preparou-se um volume conhecido de meio líquido ISP2 (International *Streptomyces* Project Medium 2) composto de 4 g/L de dextrose, 4 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de extrato de malte, o qual teve seu pH inicial ajustado em 5,0 com solução de ácido clorídrico 0,4 M, sendo o mesmo autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Após o processo de autoclavagem, foram adicionados aos tubos de ensaio contendo esporos de *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*, 7 mL de meio ISP2 e a superfície da cultura foi raspada com alça de platina para desprendimento dos esporos.

Posteriormente à raspagem, obteve-se uma solução de esporos com concentração de 10^8 esporos/mL determinada por contagem em Câmara de Neubauer (MANACHINI; FORTINA E PARTINI, 1987; SANTOS-EBINUMA, 2013). Aliquotas de 7 mL da suspensão foram então transferidas para Erlenmeyes de 500 mL contendo 43 mL de meio ISP2, de modo que a concentração final de esporos no inóculo fosse da ordem de 10^7 esporos/mL de meio.

Ao final do processo, os Erlenmeyers foram mantidos em incubador rotativo (New Brunswick Scientific, modelo C25KC; NOVA ETICA, modelo 430RD) a 250 rpm e 28°C por 24 horas. O procedimento de preparo do inóculo está ilustrado na Figura 4.1.

Figura 4.1- Esquema de preparo do inóculo.



Fonte: Acervo pessoal.

4.5 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO

Como segunda etapa do trabalho realizou-se o estudo da influência da composição do meio de cultivo na produção de pigmento vermelho por *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*.

Foram avaliadas 8 diferentes composições de meio de cultura, cujas composições estão devidamente especificadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Composições de meio de cultivo avaliadas no bioprocesso.

Meio de Cultivo	Composição	Concentração (g/L)	Referência
Meio 1- ISP2	Glicose Extrato de Levedura Extrato de Malte	4,0 4,0 10,0	LEE (2009)
Meio 2- SABOURAUD	Glicose Peptona de Soja	10,0 40,0	ZAIN et al. (2009)
Meio 3- SABOURAUD Adaptado 1	Glicose Peptona de Soja	10,0 4,0	PEREIRA; BADINO E NETO (2017)
Meio 4- SABOURAUD Adaptado 2	Glicose Peptona de Soja	20,0 10,0	SUDHA; GUPTA E AGGARWAL (2017)
Meio 5 -Pastrana	Glicose Glutamato Monossódico (MSG) K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MnSO ₄ H ₂ O CaCl ₂ . 2H ₂ O MgSO ₄ . 7H ₂ O FeSO ₄ . 7H ₂ O ZnSO ₄ . 7H ₂ O	26,0 5,0 5,0 5,0 0,03 0,662 0,5 0,5 0,01	PASTRANA et al. (1995)
Meio 6 -Kim	Glicose Glutamato Monossódico (MSG) KH ₂ PO ₄ NaNO ₃ KCl MgSO ₄ . 7H ₂ O FeSO ₄ . 7H ₂ O Extrato de Levedura	70,0 5,0 1,0 2,0 0,5 0,5 0,01 3,0	KIM et al. (2002)

Tabela 4.1 - Composições de meio de cultivo avaliadas no bioprocesso.

(Continuação)

Meio de Cultivo	Composição	Concentração (g/L)	Referência
Meio 7- Pereira	Glicose Glutamato Monossódico (MSG) K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl MgSO ₄ . 7H ₂ O FeSO ₄ . 7H ₂ O ZnSO ₄ . 7H ₂ O Extrato de Levedura	10,0 7,6 1,5 1,5 0,4 4,8 0,1 0,01 1,0	PEREIRA E KILIKIAN (2001)
Meio 8- Pastrana Adaptado	Glicose (NH ₄) ₂ SO ₄ K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MnSO ₄ H ₂ O CaCl ₂ . 2H ₂ O MgSO ₄ . 7H ₂ O FeSO ₄ . 7H ₂ O ZnSO ₄ . 7H ₂ O	26,0 1,95 5,0 5,0 0,03 0,662 0,5 0,5 0,01	Adaptado de PASTRANA et al. (1995)

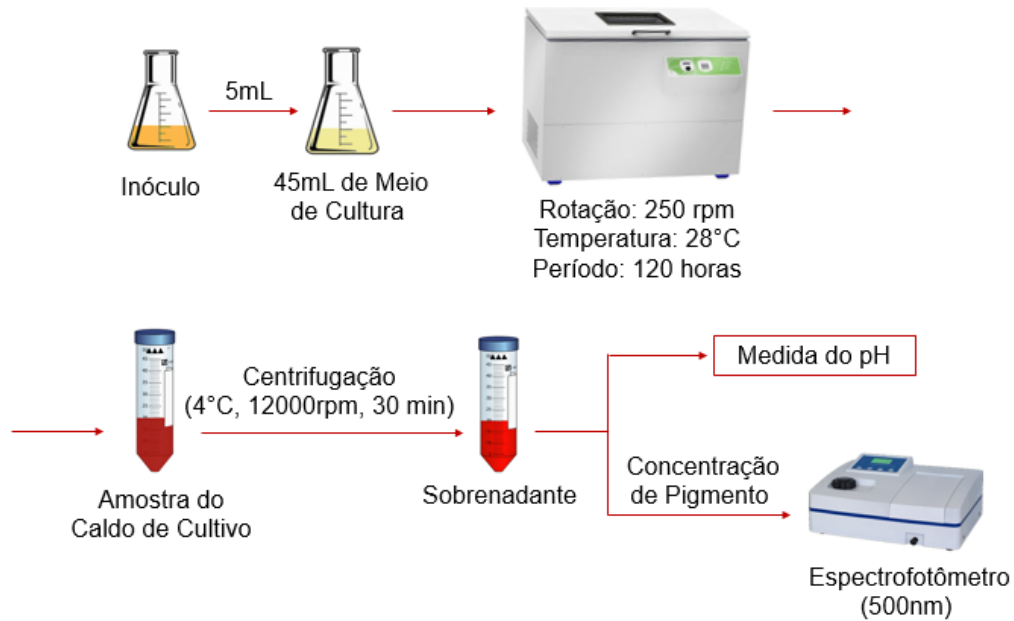
Fonte: Acervo Pessoal.

Após o preparo do inóculo, conforme descrito no item 4.4, foram inoculados 5 mL de suspensão a cada Erlenmeyer de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura.

Para cada meio de cultura avaliado, foram preparados 3 Erlenmeyers de 500 mL com um volume final de caldo de 50 mL, os quais foram devidamente esterilizados a 121°C por 20 minutos, anteriormente a etapa de inoculação.

Finalizada a inoculação dos Erlenmeyers, os mesmos foram mantidos em incubador rotativo a 250 rpm e 28°C por um período de 120 horas, sendo as amostras independentes retiradas a cada 24 horas, quando alíquotas de 10 mL foram tratadas e submetidas a análise de pH e de absorvância à 500 nm de modo a se determinar a produção de pigmento, como ilustrado na Figura 4.2.

Figura 4.2- Esquema do ensaio para avaliação da composição do meio de cultivo.



Fonte: Acervo pessoal.

Os dados obtidos foram tratados e submetidos a análise estatística, via método de Tukey, de modo a obter a composição mais favorável ao processo.

4.6 CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Uma vez definido o melhor meio de cultura para a produção de pigmento de acordo com metodologia descrita no item 4.5, foram preparados 1800 mL desse meio fixando o valor do $pH_{inicial}$ em 5,0, sendo esse volume armazenado em frasco Schott graduado de 2 L. O mesmo foi autoclavado a 121°C por 20 minutos.

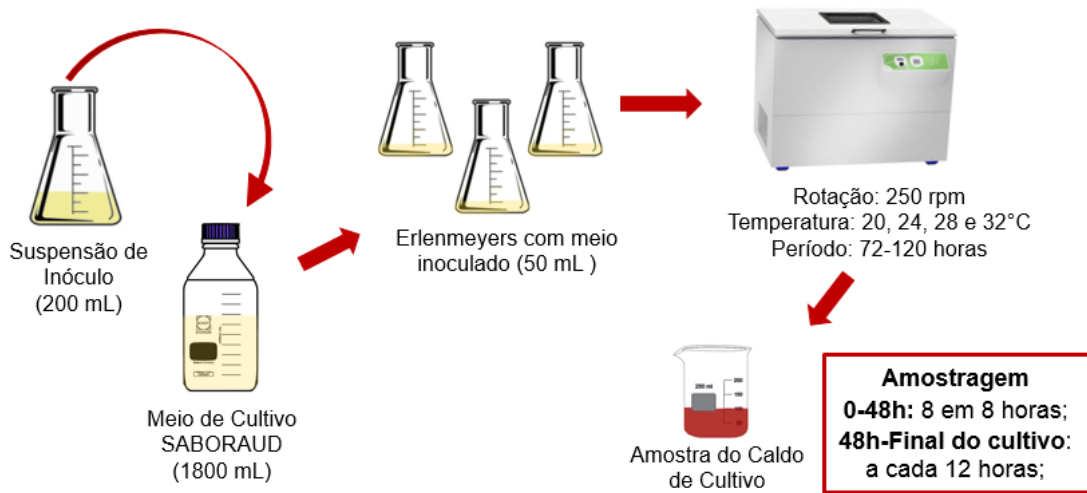
Após o resfriamento, foram inoculados 200 mL de suspensão micelial obtida através do preparo do inóculo, descrito no item 4.4. O conteúdo foi homogeneizado em agitador magnético e distribuiu-se 50 mL do meio inoculado em frascos Erlenmeyers de 500 mL (Figura 4.3).

Os Erlenmeyers foram mantidos em incubador rotativo (New Brunswick Scientific, modelo C25KC; NOVA ETICA, modelo 430RD) a 250 rpm sob as temperaturas de 20, 24, 28 e 32°C.

Os ensaios foram realizados em triplicata e as amostragens ocorreram a cada 8 horas nas primeiras 48 horas e, posteriormente, de 12 em 12 horas até o final do cultivo, caracterizado pela estabilização da produção de pigmento. Ao longo dos cultivos foram acompanhados o pH,

o crescimento celular, o consumo de glicose e a produção de pigmento.

Figura 4.3- Esquema do cultivo em frascos agitados em diferentes temperaturas.



Fonte: Acervo pessoal.

4.7 CULTIVOS EM BIORREATOR DE BANCADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Para validação dos resultados de produção de pigmento obtidos em incubador rotativo, foram realizados cultivos em biorreator de bancada de 4 L de capacidade útil que apresentaram três etapas: preparo da cultura estoque de trabalho, preparo do inóculo e cultivo submerso, sendo a primeira etapa descrita no item 4.3.

A partir da cultura estoque preparada, 18 tubos inclinados (*slants*) contendo esporos de *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*, foram removidos conforme descrito na seção 4.4, de modo a obter-se um volume de aproximadamente 126 mL de suspensão de esporos, nos quais foram adicionados 7 mL em cada Erlenmeyer de 500 mL contendo 43 mL de meio líquido ISP2 (pH_{inicial} 5,0).

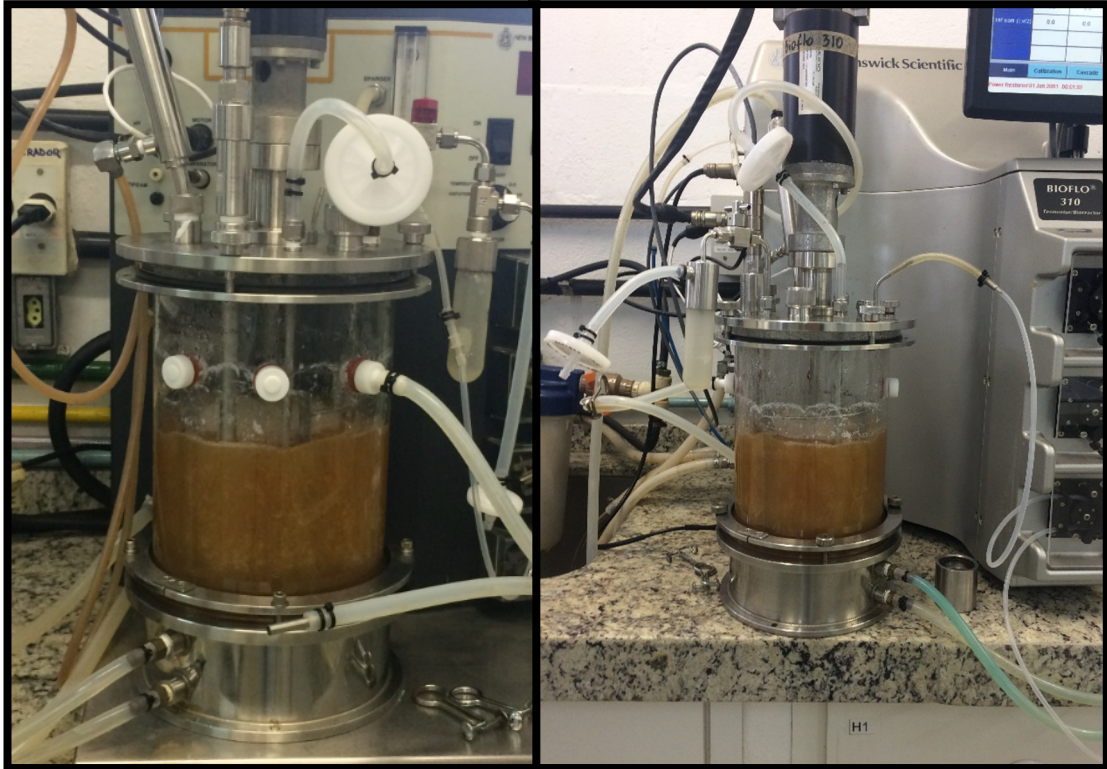
Os Erlenmeyers foram mantidos em incubador rotativo (New Brunswick Scientific, modelo C25KC; NOVA ETICA, modelo 430RD) a 250 rpm e 28°C por 24 horas, constituindo-se assim o inóculo dos cultivos em biorreator.

Após o período de incubação, o volume de inóculo (800 mL) foi dividido igualmente em volumes de 400 mL, os quais foram transferidos assepticamente para dois frascos e posteriormente inoculados nos biorreatores.

Os cultivos foram realizados em biorreatores de 4 L de capacidade útil (New Brunswick Scientific, modelos BIOFLO 310 e BIOFLO IIc) (Figura 4.4) contendo cada um

deles 3,6 L de meio de cultura, previamente autoclavados a 121°C por 50 minutos. Após estabilização dos meios de cultura, foram transferidos 400 mL de inóculo para cada biorreator, dando início aos cultivos.

Figura 4.4 - Biorreatores de bancada.



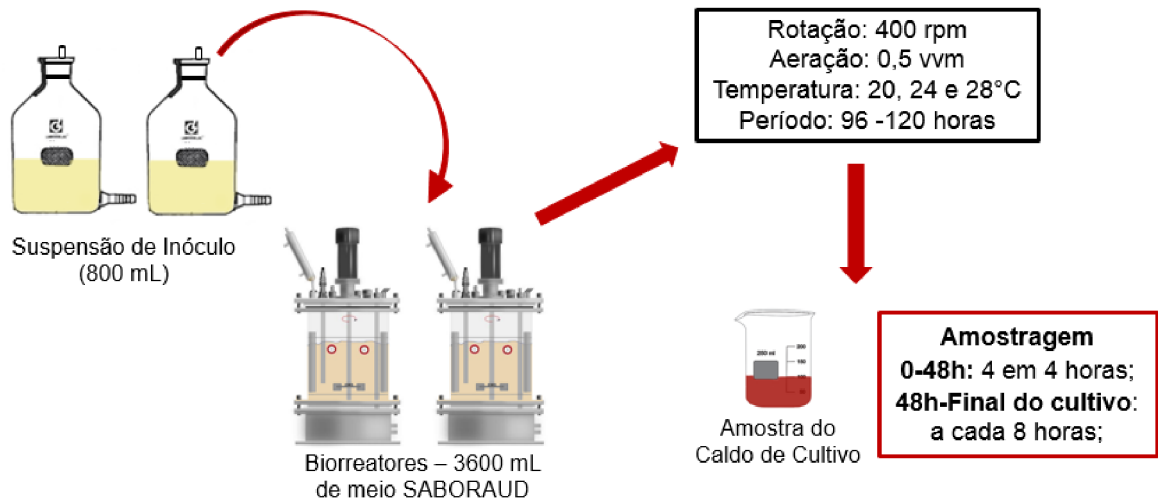
Fonte: Acervo pessoal.

Foram realizados três cultivos em duplicata a 20, 24 e 28°C, mantendo-se as condições de agitação e aeração em 400 rpm e 0,5 vvm, respectivamente (CHO et al., 2002a; GUNASEKARAN E POORNIAMMAL, 2008).

Alíquotas de 20 mL foram retiradas de 4 em 4 horas durante as primeiras 48 horas de cultivo e, posteriormente, a cada 8 horas até o término do mesmo, caracterizado pela estabilização da produção de pigmento. Estas, foram tratadas e analisadas conforme descrito na seção 4.8, de modo a se acompanhar a variação do pH, o consumo de glicose, o crescimento celular (biomassa) e a produção de pigmento.

A Figura 4.5 ilustra o esquema das etapas realizadas nos ensaios em biorreatores de bancada.

Figura 4.5 - Esquema experimental dos ensaios em biorreatores de bancada.



Fonte: Acervo pessoal.

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.8.1 Determinação do pH

O pH dos caldos de cultivo foi aferido por meio de um pHmetro Qualxtron (modelo QX 1500).

4.8.2 Determinação da concentração celular

A concentração de biomassa fúngica foi quantificada mediante gravimetria, onde um volume conhecido de caldo foi filtrado em membrana de 0,45 μm de diâmetro de poro, previamente seca e pesada. Posteriormente, o material foi submetido a secagem em estufa a 60°C por um período de 48 horas. Ao final desse período, pesou-se o material de modo a obter as concentrações de biomassas correspondentes a cada intervalo de tempo por meio da equação 3.

$$C_X \text{ (g/L)} = \frac{(m_{\text{Final}} - m_{\text{Inicial}})}{V_{\text{amostra}}} \quad (3)$$

onde:

C_X : concentração celular (g/L).

m_{Inicial} : massa da membrana vazia (g).

m_{Final} : massa da membrana contendo a biomassa seca após o processo de secagem (g).

V_{amostra} : volume de caldo amostrado (L).

4.8.3 *Determinação da concentração de glicose*

Na determinação da concentração de glicose, bem como, da produção de pigmento, o caldo de fermentação foi primeiramente centrifugado a 4°C e 12000 rpm por 30 minutos. Após o processo de centrifugação, o sobrenadante foi filtrado a vácuo em membrana de 0,45µm para total separação das células.

A concentração de glicose foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras foram filtradas e 20 microlitros foram injetados em um sistema cromatográfico (Waters, USA) equipado com detector de índice de refração e coluna Sugar-Pak I (300 x 6,5 mm, 10 µm, Waters) mantida a 80°C. Como eluente foi utilizada água ultrapura a uma vazão de 0,5 mL/min.

4.8.4 *Determinação da concentração de pigmento*

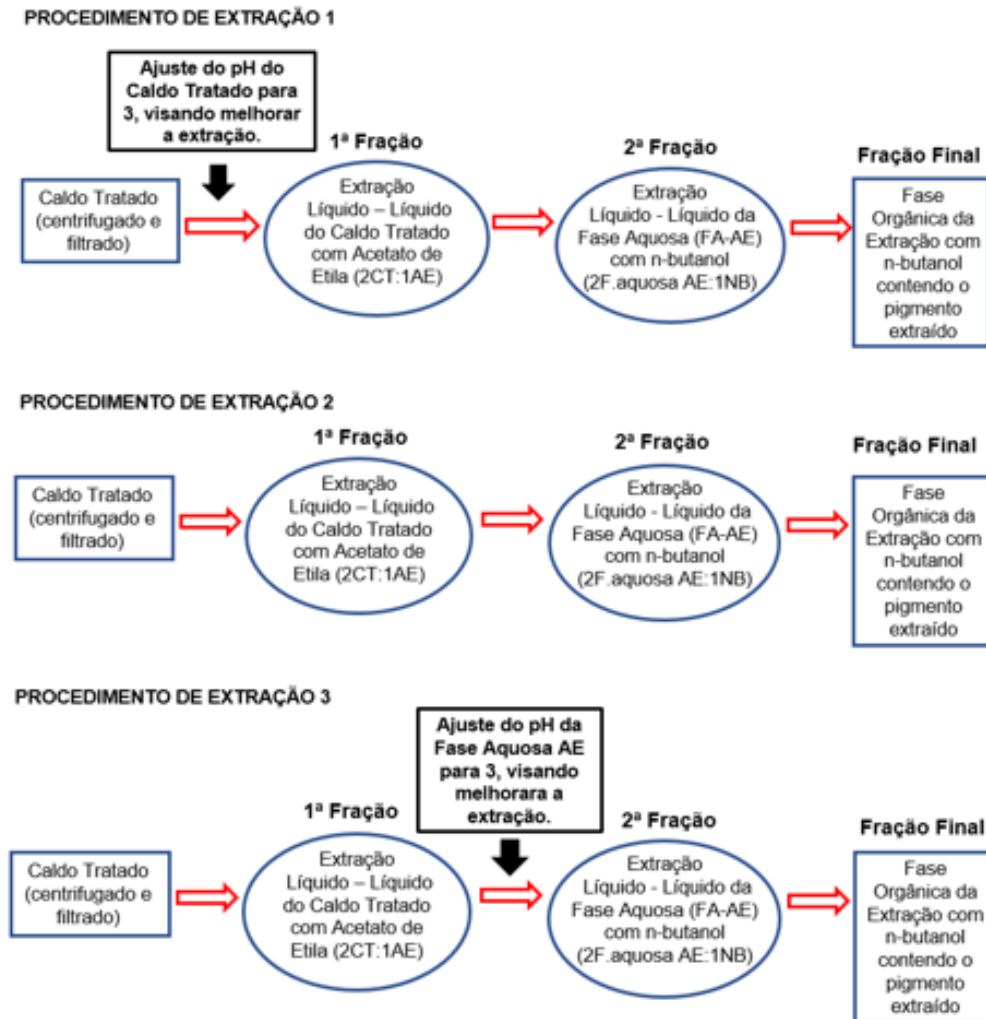
A produção de pigmento foi estimada através da medida da absorbância do sobrenadante filtrado utilizando espectrofotômetro-UV (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences) e considerando o fator de diluição de cada amostra. Para determinar o comprimento de onda correspondente à máxima absorção para o pigmento vermelho, realizou-se o escaneamento da amostra do caldo de fermentação livre de células na faixa de 300 a 600 nm. Os resultados obtidos foram expressos em termos de Unidades de Absorbância a 500 nm (UA₅₀₀), o que concorda com a máxima absorção para pigmentos vermelhos reportados pela literatura (CHATTERJEE et al., 2009; CHRISTIE, 2001; SINGH et al., 2015).

4.9 DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA (UA₅₀₀) E CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTO (g/L)

Para se obter a concentração de pigmento em g/L referente à leitura da absorbância do caldo a 500 nm (ABS₅₀₀), fez-se necessária a realização de alguns procedimentos.

Primeiramente, foram centrifugadas a 4°C e 12000 rpm por 30 minutos, amostras do caldo fermentado dos cultivos a 20, 24 e 28°C. Os mesmos foram filtrados a vácuo em filtros de membrana de 0,45µm, de modo a garantir a retirada total de células. Frações da amostra do caldo tratado (centrifugado e filtrado) proveniente do cultivo de 20°C foram utilizadas em três diferentes procedimentos de extração do pigmento, conforme ilustra a Figura 4.6.

Figura 4.6 - Procedimentos de extração realizados com amostras do caldo de cultivo conduzido a 20°C.



Fonte: Acervo pessoal.

Após os procedimentos de extração, volumes conhecidos das frações extraídas do caldo tratado foram adicionados em tubos Falcon previamente secos e pesados. Estes foram submetidos a um processo de secagem em um rotoevaporador (Thermo SC210A/Thermo RVT4104) até que todo o solvente e a água contida nas amostras fossem evaporados. Os tubos Falcon foram novamente pesados de modo a se obter a concentração de sólidos solúveis do caldo tratado (C_{SSCT}) e a concentração do pigmento extraído (C_{PE}) nas amostras obtidas de cada rotina de extração utilizando a equação 4.

$$C_i \text{ (g/L)} = \frac{(m_{\text{Final}} - m_{\text{Inicial}})}{V_{\text{amostra}}} \quad (4)$$

onde:

C_i : concentração de sólidos solúveis do caldo tratado (C_{SSCT}) ou do pigmento extraído (C_{PE}) (g/L).

$m_{Inicial}$: massa do tubo Falcon vazio (g).

m_{Final} : massa do tubo Falcon contendo pigmento seco (g).

$V_{amostra}$: volume de caldo tratado ou das frações extraídas (L).

Simultaneamente, as respectivas absorvâncias foram mensuradas por espectrofotômetro UV (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences) no comprimento de onda de 500 nm e considerando os fatores de diluição de cada amostra.

Após a obtenção das concentrações em g/L e de suas respectivas absorvâncias (ABS_{500}), executou-se o ajuste de um modelo linear através do software OriginPro 9.0 para as amostras de 20°C do caldo tratado e para as amostras resultantes dos procedimentos de extração.

A relação linear entre concentração de sólidos solúveis e absorvância do caldo tratado é dada pela equação 5:

$$C_{SSCT} = \frac{1}{A} \cdot ABS_{SSCT} \cdot diluição \quad (5)$$

onde:

C_{SSCT} : concentração de sólidos solúveis no caldo tratado (g/L).

ABS_{SSCT} : absorvância do caldo tratado (UA_{500}).

A : constante.

A relação linear entre concentração de pigmento extraído e absorvância da fração obtidos pelos Procedimentos de Extração é dada pela equação 6:

$$C_{PE} = \frac{1}{B} \cdot ABS_{PE} \cdot diluição \quad (6)$$

onde:

C_{PE} : concentração de pigmento na fração extraída (g/L).

ABS_{PE} : absorvância do pigmento na fração extraída (UA_{500}).

B : constante.

Dividindo-se a equação 5 pela equação 6, obtém-se a equação 7, que ao ser substituída na equação 6 resulta na equação 8, ou seja, na relação direta entre a absorvância do caldo tratado (ABS_{SSCT}) e a concentração de pigmento na fração extraída.

$$\frac{C_{SSCT}}{C_{PE}} = \frac{B}{A} \cdot \frac{ABS_{SSCT} \cdot diluição}{ABS_{PE} \cdot diluição} \rightarrow ABS_{PE} \cdot diluição = \frac{B}{A} \cdot \frac{C_{PE0}}{C_{SSCT0}} \cdot ABS_{SSCT} \cdot diluição \quad (7)$$

$$C_{PE} = \frac{1}{B} \cdot \frac{B}{A} \cdot \frac{C_{PE0}}{C_{SSCT0}} \cdot ABS_{SSCT} \cdot diluição \rightarrow C_{PE} = \frac{1}{A} \cdot \frac{C_{PE0}}{C_{SSCT0}} \cdot ABS_{SSCT} \cdot diluição \quad (8)$$

onde:

C_{SSCT} : concentração de sólidos solúveis no caldo tratado (g/L).

ABS_{SSCT} : absorvância do caldo tratado (UA₅₀₀).

C_{PE} : concentração de pigmento na fração extraída (g/L).

ABS_{PE} : absorvância do pigmento na fração extraída (UA₅₀₀).

C_{PE0} : concentração de pigmento na fração extraída original (g/L).

C_{SSCT0} : concentração de sólidos solúveis no caldo tratado original (g/L).

A : constante.

B : constante.

Logo, para cada procedimento de extração da amostra de 20°C obteve-se uma expressão que correlacionasse diretamente a absorvância do caldo tratado com a concentração de pigmento extraído (equação 8).

Ao se obter tais expressões, realizou-se a avaliação do procedimento de extração que apresentou melhor Eficiência de Recuperação (ER em %) obtida pela equação 9, bem como, estimou-se, por meio da equação 10, a porcentagem de pigmento presente no caldo tratado original (PCTO em %):

$$ER (\%) = \frac{C_{PE} \cdot V_{nB}}{C_{PCT} \cdot V_{CT}} \cdot 100 \quad (9)$$

$$PCTO (\%) = \frac{m_{PE}}{m_{SSCT}} = \frac{C_{PE} \cdot V_{nB}}{C_{SSCT} \cdot V_{CT}} \quad (10)$$

onde:

C_{PCT} : concentração de pigmento no caldo tratado (g/L).

V_{nB} : volume de solvente n-butanol utilizado na etapa final do procedimento de extração (L).

C_{PE} : concentração de pigmento no caldo extraído (g/L).

V_{CT} : volume de caldo tratado submetido aos procedimentos de extração (L).

C_{SSCT} : concentração de sólidos solúveis do caldo tratado (g/L).

Por fim, após a determinação da metodologia de extração de maior Eficiência de Recuperação (ER em %), frações das amostras dos cultivos a 24 e 28°C foram submetidas ao mesmo tratamento, resultando em expressões semelhantes a equação 8, ou seja, para cada ensaio de temperatura (20, 24 e 28°C) foram obtidas expressões que correlacionassem diretamente a absorvância do caldo tratado (ABS_{SSCT}) e a concentração de pigmento existente no mesmo (C_{PE}) após a extração.

4.10 MODELAGEM CINÉTICA DO PROCESSO

A partir dos dados experimentais obtidos nos cultivos de *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* nas diferentes condições de temperatura foram determinados os parâmetros cinéticos e de rendimento que seguem.

A velocidade máxima de crescimento celular (μ_{max}) foi obtida através do ajuste da equação 11 aos dados experimentais de concentração celular em função do tempo de cultivo na fase exponencial de crescimento celular.

$$\ln C_X = \ln C_{X0} + \mu_{max} \cdot t \quad (11)$$

onde:

C_X : concentração celular ao longo da fase de crescimento exponencial (gx/L).

C_{X0} : concentração celular do início da fase de crescimento exponencial (gx/L).

μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}).

t: tempo (h).

O coeficiente global de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foi obtido pela equação 12:

$$Y_{X/S} = \frac{C_{Xf} - C_{X0}}{C_{S0}} \quad (12)$$

onde:

$Y_{X/S}$: coeficiente global de conversão de substrato a células (gx/gS).

C_{Xf} : concentração celular ao término da concentração de substrato (glicose) (gx/L).

C_{X0} : concentração celular inicial da fase de crescimento – após a fase lag (gx/L).

C_{S0} : concentração inicial de glicose (gs/L).

A produtividade volumétrica em pigmento (P_P) foi calculada pela equação 13:

$$P_P = \frac{C_P - C_{P0}}{t} \quad (13)$$

onde:

P_P : produtividade volumétrica em pigmento (gp/(L·h)).

C_P : concentração de pigmento no tempo t (gp/L).

C_{P0} : concentração inicial de pigmento (gp/L).

t: tempo (h).

A produtividade específica em pigmento ($P_{P/X}$) foi calculada pela equação 14:

$$P_{P/X} = \frac{C_P - C_{P0}}{(C_X - C_{X0}) \cdot t} \quad (14)$$

onde:

$P_{P/X}$: produtividade específica em pigmento ($g_P/(g_X \cdot h)$).

C_P : concentração de pigmento no tempo t (g_P/L).

C_X : concentração celular no tempo t (g_X/L).

C_{P0} : concentração inicial de pigmento (g_P/L).

C_{X0} : concentração celular inicial (g_X/L).

C_{P0} : concentração inicial de pigmento (g_P/L).

C_{X0} : concentração celular inicial (g_P/L).

Foram propostas duas modelagens para representar a cinética do bioprocesso incluindo o crescimento celular, o consumo de substrato e a produção de pigmento. Estes estão descritos a seguir.

Modelagem cinética A

A modelagem cinética A baseou-se numa proposta convencional. Como hipóteses considerou-se a glicose como o único substrato limitante, morte celular ao longo de todo o bioprocessos e o pigmento como um produto não associado ao crescimento. Foram então realizados balanços de massa para as células (X), substrato (glicose: S) e produto (pigmento: P), considerando o processo em batelada. As equações 15 a 17 descrevem as variações das concentrações de X, S e P ao longo do cultivo em batelada.

$$\frac{dC_X}{dt} = r_X - r_m \quad (15)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{\mu \cdot C_X}{Y_{X/S}} \quad (16)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \beta \cdot C_X \quad (17)$$

onde:

C_X : concentração celular (g_X/L).

C_S : concentração de substrato (glicose) (g_S/L).

C_P : concentração de pigmento (g_P/L).

r_X : velocidade de crescimento celular ($g_X/(L \cdot h)$).

r_m : velocidade de morte celular ($g_X/(L \cdot h)$).

μ : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}).

$Y_{X/S}$: coeficiente de rendimento de substrato a células (g_X/g_S).

β : constante de formação de produto ($\text{g}_P/(\text{g}_X \cdot \text{h})$).

As velocidades de crescimento (r_X) e de morte celular (r_m) são expressas pelas equações 18 e 19.

$$r_X = \mu \cdot C_X \quad (18)$$

$$r_m = k_m \cdot C_X \quad (19)$$

onde:

k_m : constante de morte celular (h^{-1}).

Por fim, de modo a descrever a cinética de crescimento celular, considerou-se o modelo de Contois, dado pela equação 20:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{C_S}{K_{SX} \cdot C_X + C_S} \quad (20)$$

onde:

K_{SX} : constante de Contois ($\text{g}_S \text{g}_X^{-1}$).

Modelagem cinética B

Na modelagem cinética B, uma proposta não convencional, considerou-se a existência de 3 reações no bioprocesso, conforme expresso pelas equações 21 a 23:



sendo S o substrato (glicose), X é a biomassa, FN é a fonte de nitrogênio (peptona), PR é o precursor da molécula de pigmento e P é o pigmento.

De acordo com a proposta, as células (X) crescem consumindo glicose (S) de acordo com a reação (21). Como modelo de crescimento considerou-se o proposto por Contois, que representa adequadamente o crescimento de fungos filamentosos. De acordo com a reação (22), o fungo (X) consome a fonte de nitrogênio (FN) gerando um precursor (PR) da molécula de pigmento (P). A medida que o precursor (PR) é formado, as células convertem esse composto intermediário em produto (pigmento: P).

Com base nas hipóteses estabelecidas, realizou-se o balanço de massa para as espécies envolvidas, no caso células (X), glicose (S), fonte de nitrogênio (FN), precursor (PR) e produto (pigmento: P), considerando o processo em batelada.

As equações 24 a 28 descrevem as variações das concentrações X, S, FN, PR e P ao longo do cultivo em batelada.

$$\frac{dC_X}{dt} = r_X - r_m \quad (24)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{-\mu \cdot C_X}{Y_{X/S}} \quad (25)$$

$$\frac{dC_{FN}}{dt} = -k_1 \cdot C_{FN} \cdot C_X \quad (26)$$

$$\frac{dC_{PR}}{dt} = k_2 \cdot C_{FN} \cdot C_X - k_3 \cdot C_{PR} \cdot C_X \quad (27)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = k_4 \cdot C_{PR} \cdot C_X \quad (28)$$

onde:

C_X : concentração celular (g_X/L).

C_S : concentração de glicose (g_S/L).

C_{FN} : concentração de fonte de nitrogênio (g_{FN}/L).

C_{PR} : concentração de precursor (g_{PR}/L).

C_P : concentração de pigmento (g_P/L).

r_X : velocidade de crescimento celular (g_X/(L·h)).

r_m : velocidade de morte celular (g_X/(L·h)).

μ : velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹).

$Y_{X/S}$: coeficiente de rendimento de substrato a células (g_X/g_S).

k_1 : constante relacionada ao consumo da fonte de nitrogênio (L/(g·h)).

k_2 : constante relacionada a produção de precursor (L/(g·h)).

k_3 : constante relacionada ao consumo de precursor (L/(g·h)).

k_4 : constante relacionada a formação de pigmento (L/(g·h)).

4.11 AJUSTE DO MODELO E ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO BIOPROCESSO

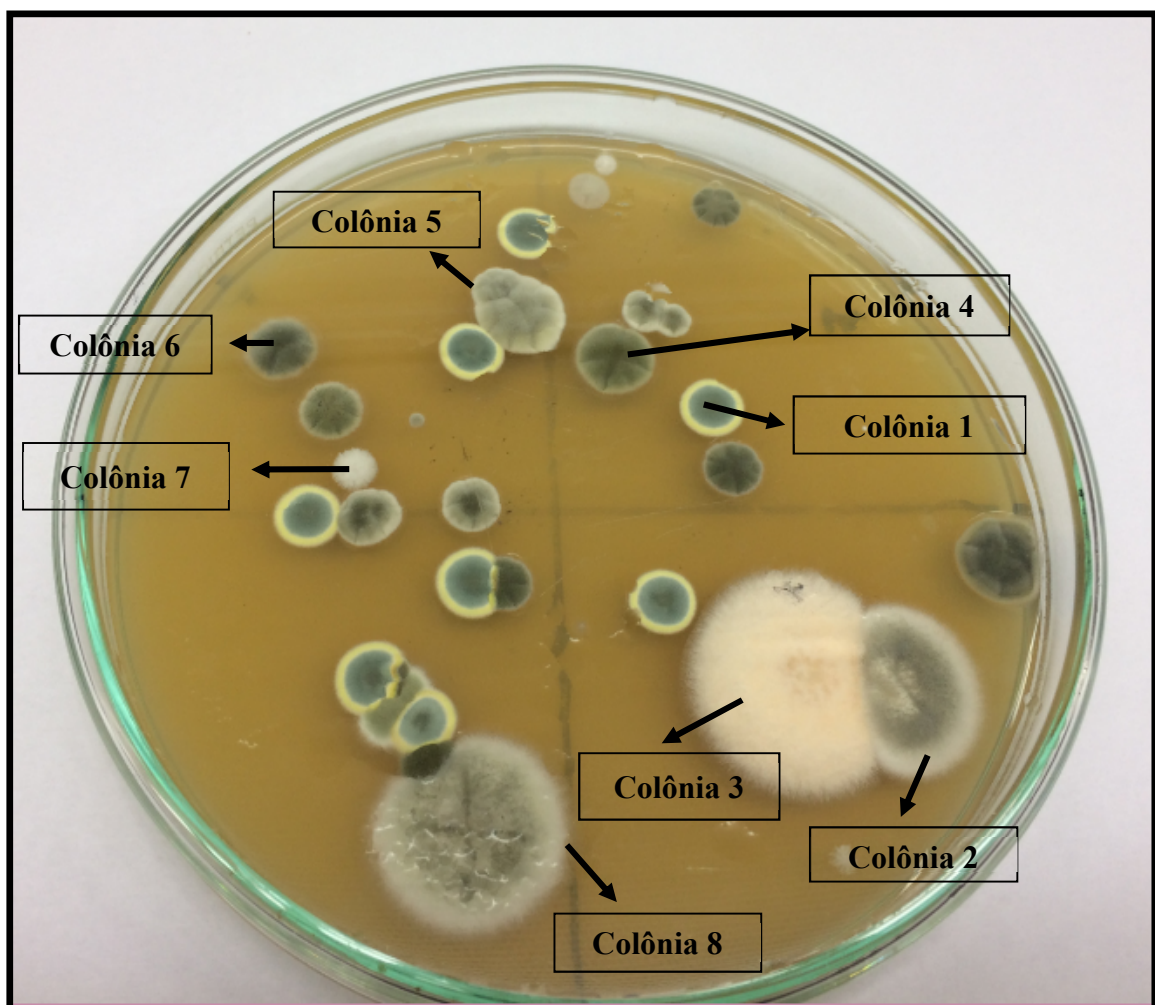
Para estimar os parâmetros cinéticos do bioprocesso utilizou-se como rotina de otimização o algoritmo de Marquardt (1963) juntamente com o algoritmo de integração DDASSL para solução numérica do sistema de equações diferenciais (equações 15 a 17 e 24 a 28). Os algoritmos foram implementados em linguagem Fortran e apresentaram como critério de otimização para o ajuste dos parâmetros a minimização da soma dos quadrados dos resíduos dividido pela média aritmética.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 TRIAGEM PARA ISOLAMENTO DA LINHAGEM E PREPARO DA CULTURA ESTOQUE DE TRABALHO

Na etapa de *screening*, após 5 dias de incubação foi possível verificar a formação de aproximadamente 8 diferentes colônias fúngicas, conforme ilustrado na Figura 5.1.

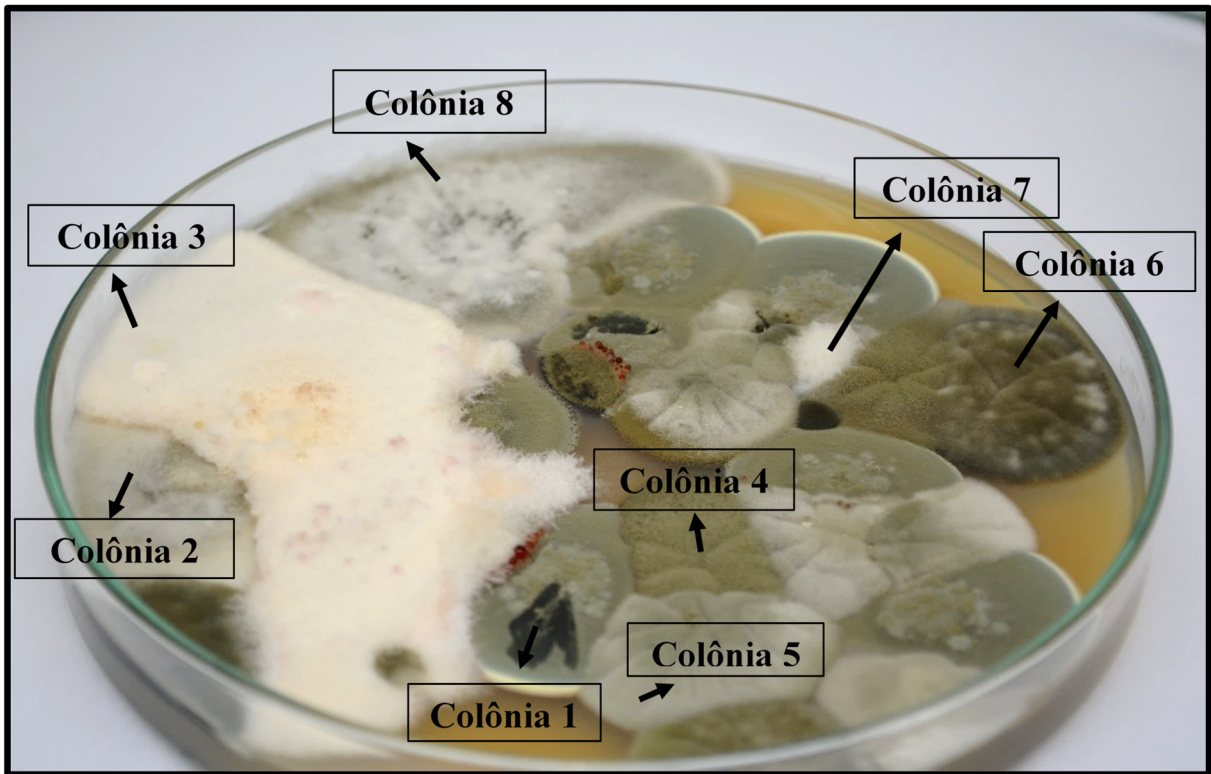
Figura 5.1 – Colônias obtidas em placa de Petri contendo meio sólido Ágar ISP2, após 5 dias de incubação.



Fonte: Acervo pessoal.

Após 10 dias de incubação observou-se que as 8 colônias apresentavam maior extensão (Figura 5.2).

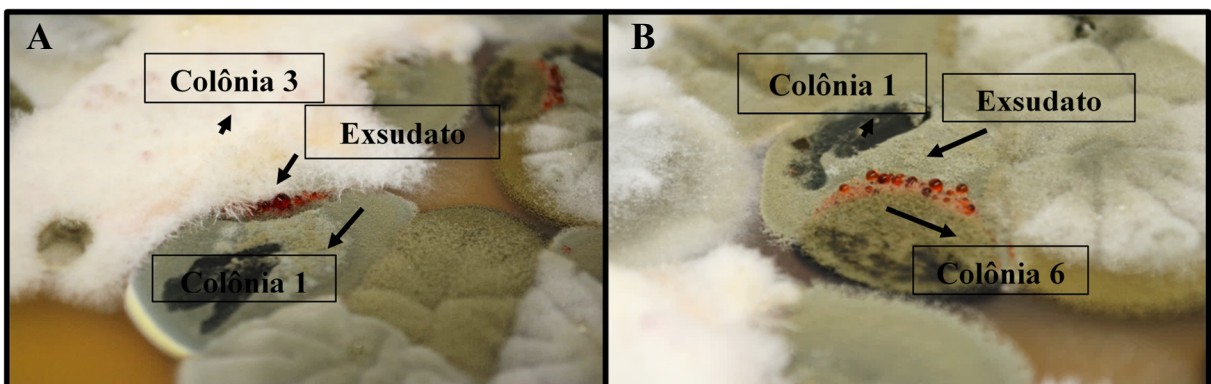
Figura 5.2 – Colônias obtidas em placa de Petri contendo meio sólido Ágar ISP2, após 10 dias de incubação.



Fonte: Acervo pessoal.

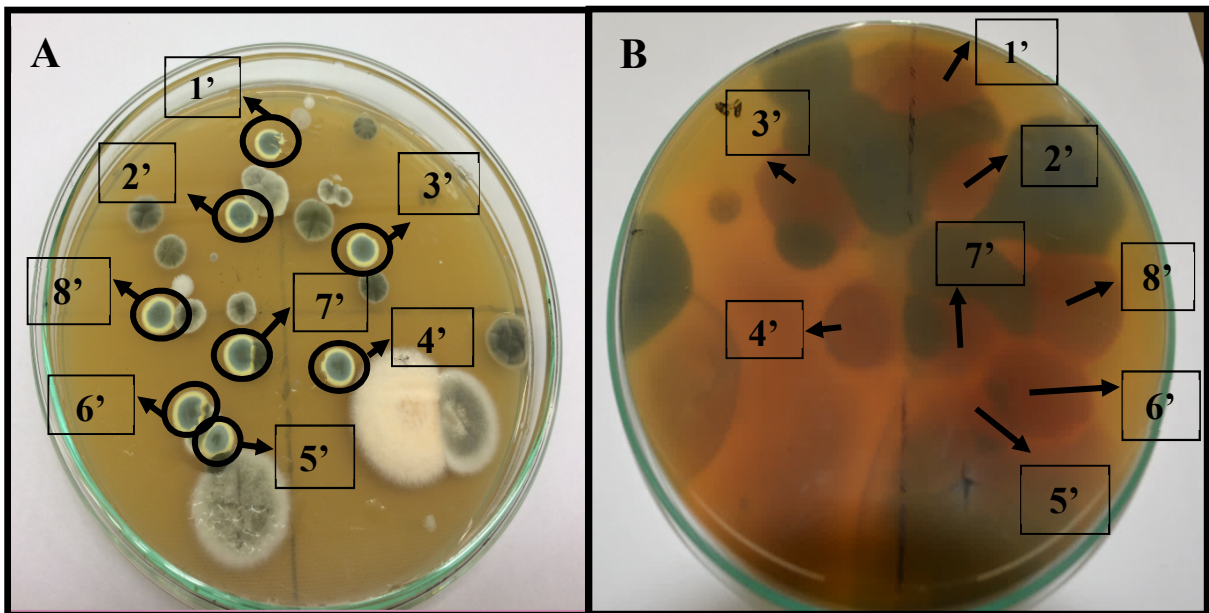
Conforme ilustram as Figuras 5.3 e 5.4, verificou-se que entre as colônias 1 e 3 e as colônias 1 e 6 houve a formação de um exsudato vermelho (pigmento). Ao se observar o verso da placa, identificou-se que a colônia 1 havia gerado um pigmento vermelho no próprio meio sólido Ágar ISP2, diferentemente das demais colônias.

Figura 5.3 – (A) Exsudato entre colônias 1 e 3 e (B) Exsudato entre colônias 1 e 6.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 5.4 – (A) Quantificação “Colônias 1” (Frente) e (B) Quantificação “Colônias 1” (Verso).

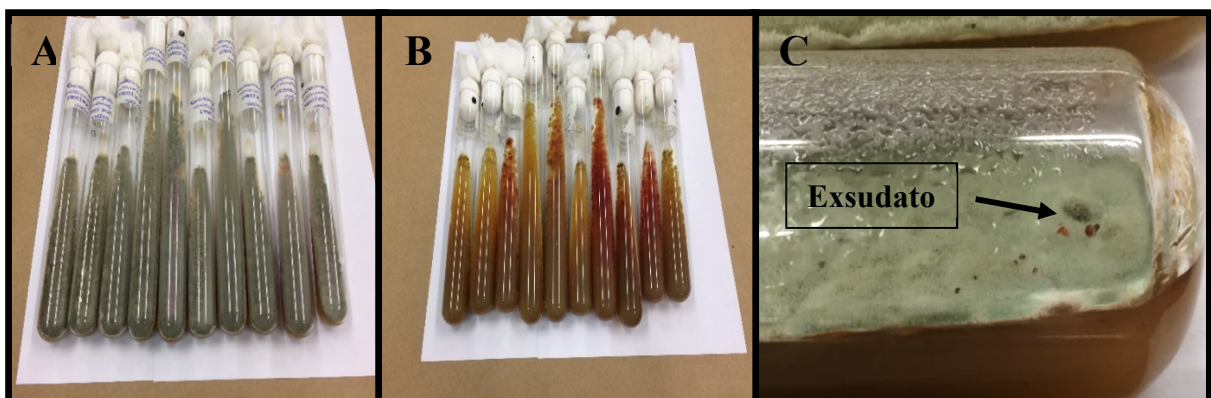


Fonte: Acervo pessoal.

Mediante a análise visual das colônias, bem como, a observação da formação de um exsudato vermelho, resultados estes que se encontravam em conformidade com os obtidos por ROMANO (2015), procedeu-se a preparação da cultura estoque de trabalho conforme descrito na secção 4.3.

Segundo mostra a Figura 5.5, verificou-se novamente a produção de pigmento vermelho em meio sólido Ágar ISP2, bem como a liberação do mesmo, via exsudação, durante a obtenção da cultura estoque de trabalho.

Figura 5.5- (A) “Slants” - Estoque de trabalho (frente), (B), “Slants” - Estoque de trabalho (verso) e (C) Exsudato no “slant” da cultura estoque de trabalho.



Fonte: Acervo pessoal.

Diante de uma análise visual, verificou-se qualitativamente que a linhagem produtora de pigmento vermelho de *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* é caracterizada por apresentar uma borda amarelada, um corpo esverdeado e um núcleo verde escuro. Além disso, a mesma, quando cultivada em meio sólido Ágar ISP2, é capaz de sintetizar um pigmento vermelho e liberá-lo via mecanismo de exsudação.

5.2 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO

As Figuras 5.6 e 5.7 ilustram os gráficos de variação de pH e de produção de pigmento (ABS_{500}) ao longo dos cultivos realizados em frascos agitados com diferentes meios de cultura avaliados (Tabela 4.1).

Figura 5.6- Variação do pH ao longo do tempo observado nos cultivos em frascos agitados com diferentes meios de cultura.

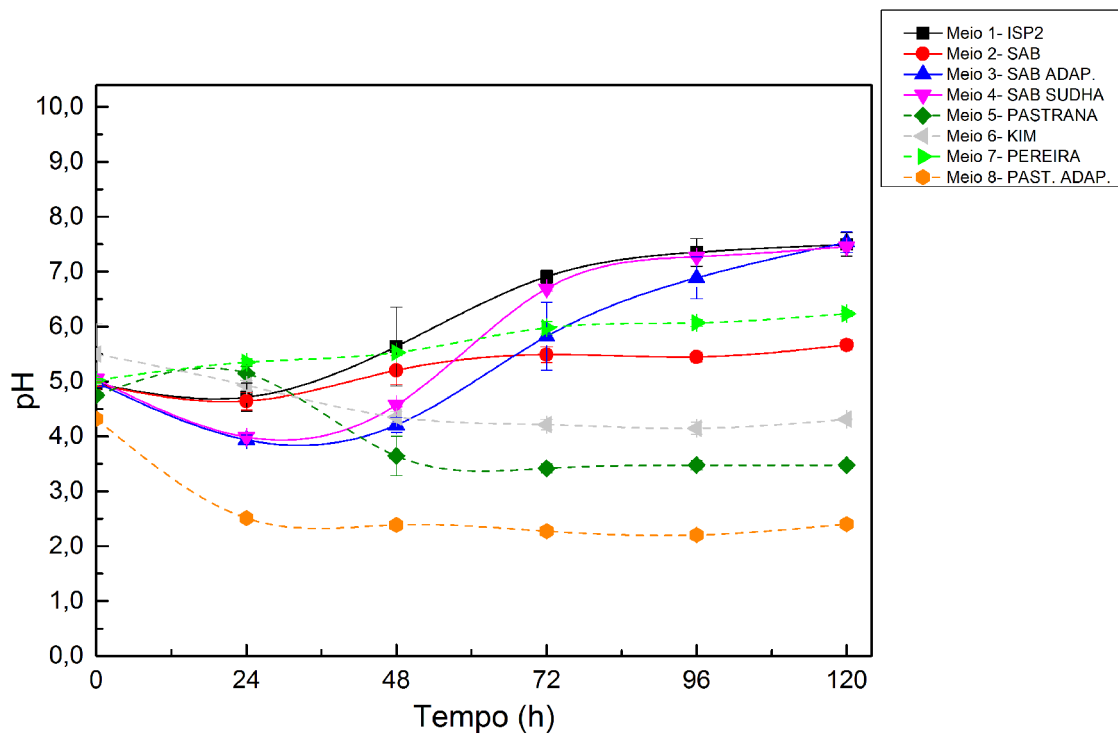
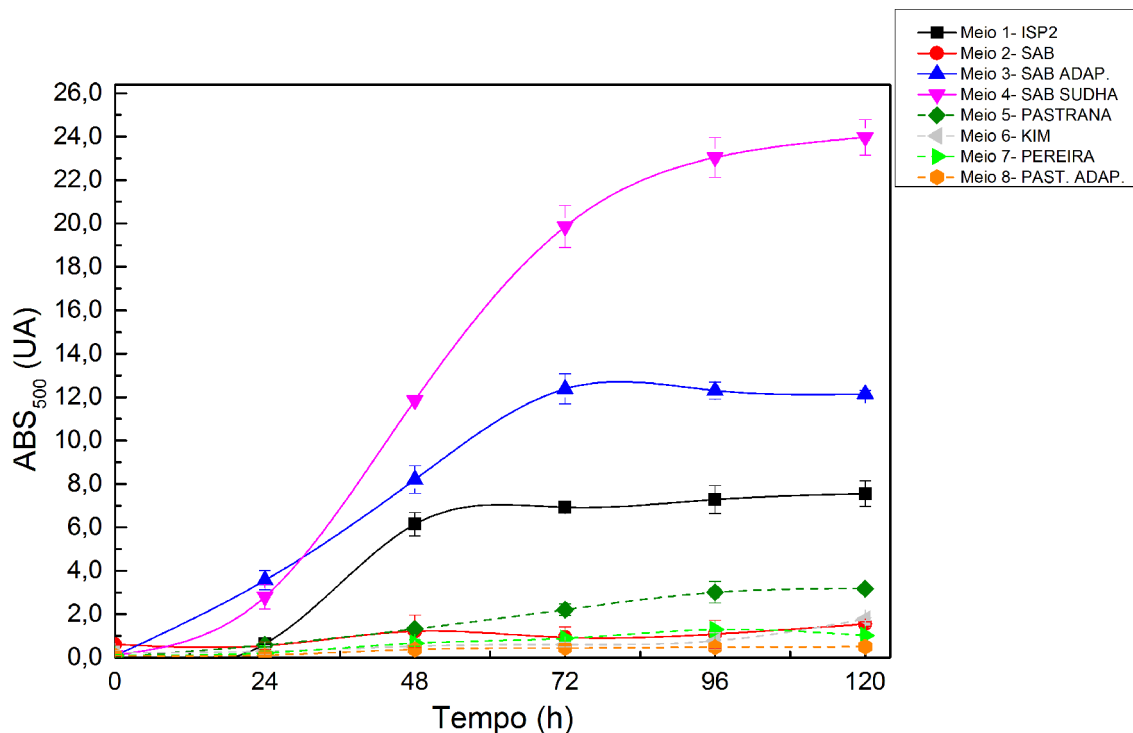


Figura 5.7- Produção de pigmento vermelho (ABS_{500}) ao longo do tempo nos cultivos em frascos agitados com diferentes meios de cultura.



Com base nas Figuras 5.6 e 5.7, observou-se que durante as primeiras 24 horas de cultivo, nas quais a concentração de pigmento se apresentava baixa ou praticamente nula para alguns meios, verificou-se uma instabilidade com relação ao pH nos cultivos em que se utilizou meios de cultura mais ricos em sais (meios 5 a 8), enquanto que para os meios 1 a 4, observou-se uma leve queda do pH.

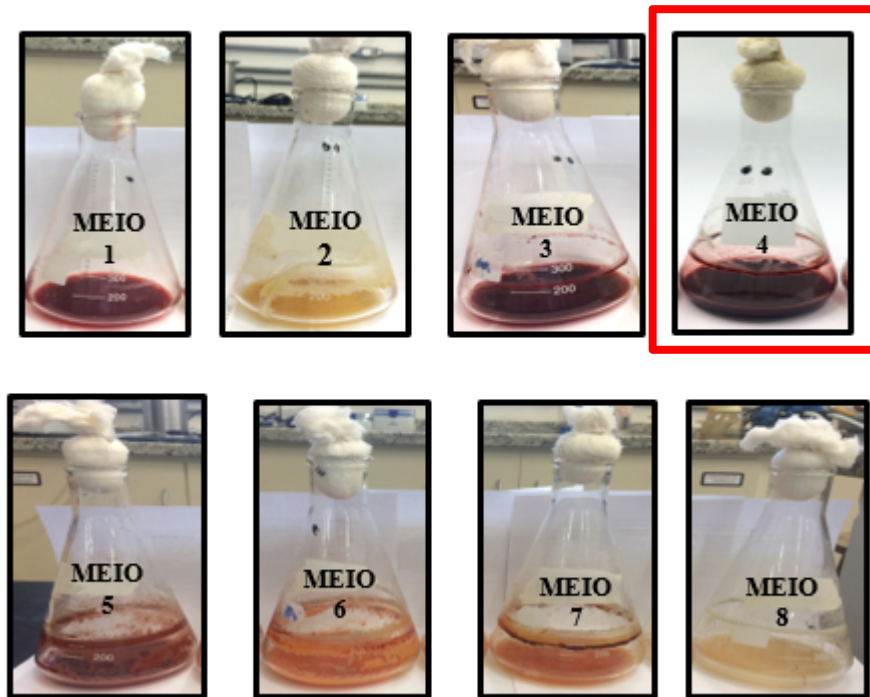
Após este período, com o efetivo início da produção de pigmento, os cultivos com meios de cultura 5 a 8 tenderam a apresentar valores de pH estáveis, assim como para os cultivos com os meios de composição 1 a 4. Contudo, observou-se que os cultivos com os meios de 1 a 4 acabaram exibindo valores de pH mais elevados frente aos meios 5 a 8, o que demonstrou que ao final do processo, esses se apresentaram mais alcalinos.

Com relação à produção de pigmento, verificou-se que de modo geral, após 72 horas de cultivo a produção tendeu a se estabilizar em todos os cultivos, independentemente do meio de cultura avaliado.

Além disso, observou-se que os meios de cultura de composição 1 a 4 favoreceram a síntese de pigmento vermelho, enquanto que os meios de composição mais rica (meios 5 a 8) não apresentaram resultados expressivos, como ilustra a Figura 5.8.

A Figura 5.8 ilustra os Erlenmeyers correspondentes às amostras de 120 horas dos cultivos com os diferentes meios de cultura avaliados.

Figura 5.8- Erlenmeyers com os caldos de cultivos dos 8 meios de cultura avaliados ao final de 120 horas de cultivo.



Fonte: Acervo pessoal.

Dentre os meios de cultura 1 a 4, verificou-se a expressiva produção de pigmento nos meios 4 (24,0 UA), 3 (12,3 UA) e 1 (7,5 UA), respectivamente. Estes resultados apresentaram-se superiores aos obtidos por ROMANO (2015), que obteve o melhor resultado de produção de pigmento (6,7 UA) no cultivo com meio de cultura ISP2, e por SUDHA; GUPTA E AGGARWAL (2017) que obtiveram uma produção de 6,01 UA com meio SABORAUD, ambos trabalhos empregando a linhagem *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*.

Para completa validação dos resultados de produção e definição do meio de cultura a ser utilizado na continuidade do estudo, realizou-se a análise estatística dos dados de produção de pigmento coletados empregando-se o método de Tukey, cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Resultado da análise estatística pelo Método de Tukey das produções de pigmento obtidas com os diferentes meios de cultivo.

<i>Meios de Cultivo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Teste de Tukey*</i>
1	7,55	0,58	C
2	1,55	0,07	E
3	12,38	0,69	B
4	23,97	1,39	A
5	3,18	0,07	D
6	1,77	0,05	E F
7	1,29	0,01	E F
8	0,50	0,01	E

*Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Diante dos resultados obtidos expressos pela Figura 5.7 e na Tabela 5.1, o meio 4 (SABORAUD), baseado no trabalho de SUDHA; GUPTA E AGGARWAL (2017) se apresentou estatisticamente como o mais favorável a produção de pigmento vermelho pela linhagem *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*. Sendo este, portanto, o meio de cultivo empregado nas demais etapas desenvolvidas ao longo do projeto.

5.3 CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

As Figuras 5.9 a 5.12 ilustram as variações de pH, concentração de glicose (C_S), concentração de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidos nos cultivos realizados em frascos agitados nas temperaturas de 20, 24, 28 e 32°C.

Figura 5.9 - Variações de pH, concentração de glicose (C_S), concentração de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em frascos agitados a 20°C.

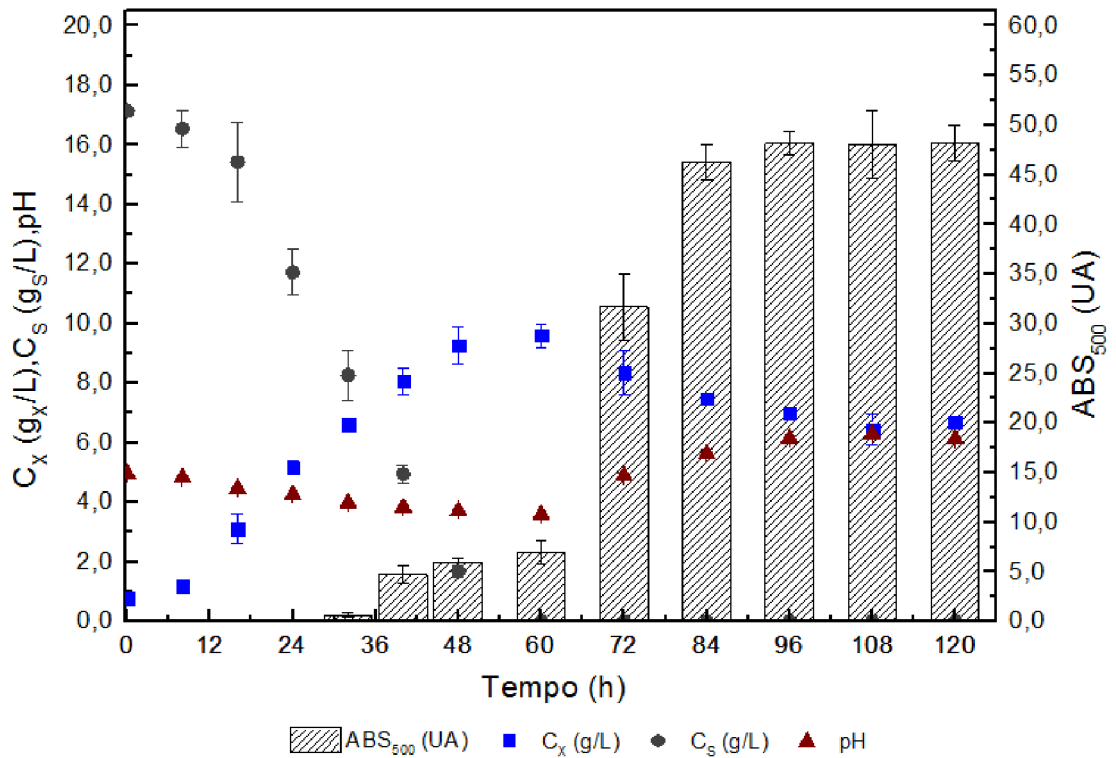


Figura 5.10 - Variações de pH, concentração de glicose (C_S), concentração de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em frascos agitados a 24°C.

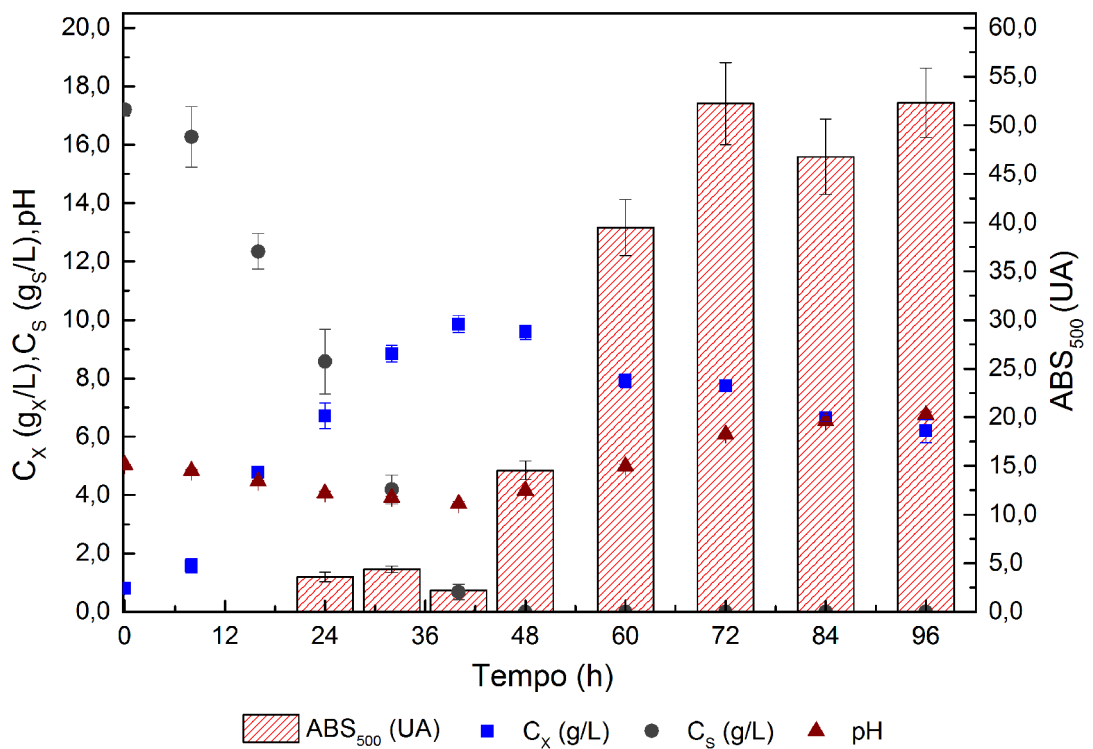


Figura 5.11 - Variações de pH, concentração de glicose (C_s), concentração de biomassa (C_x) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em frascos agitados a 28°C.

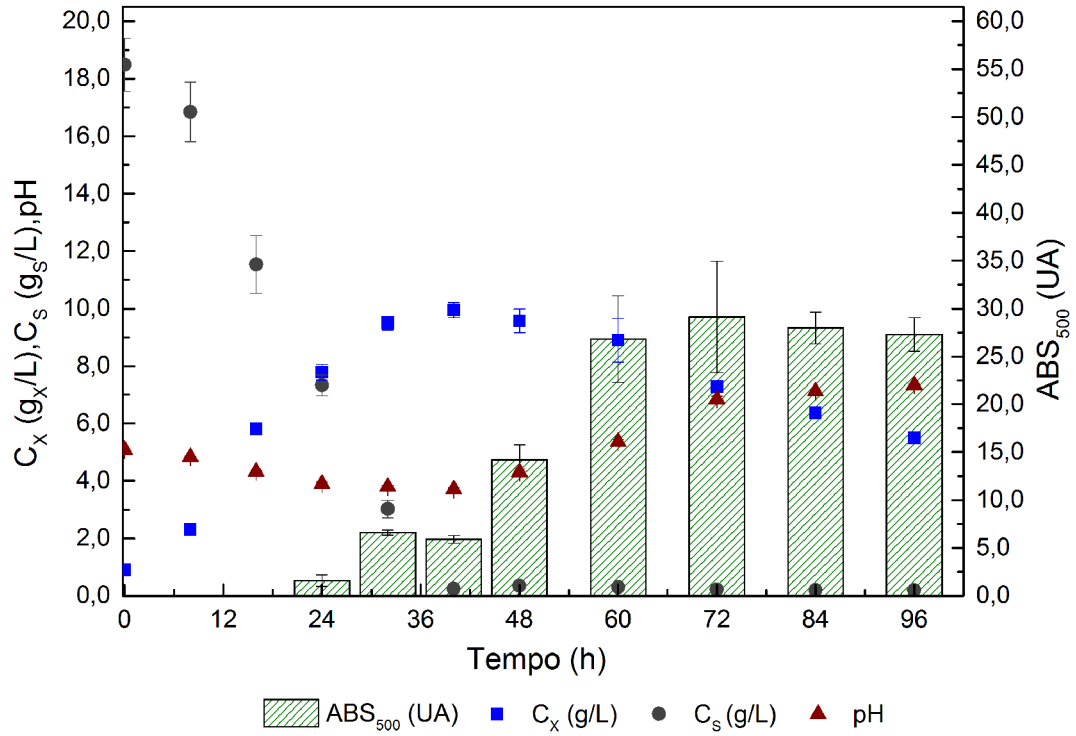
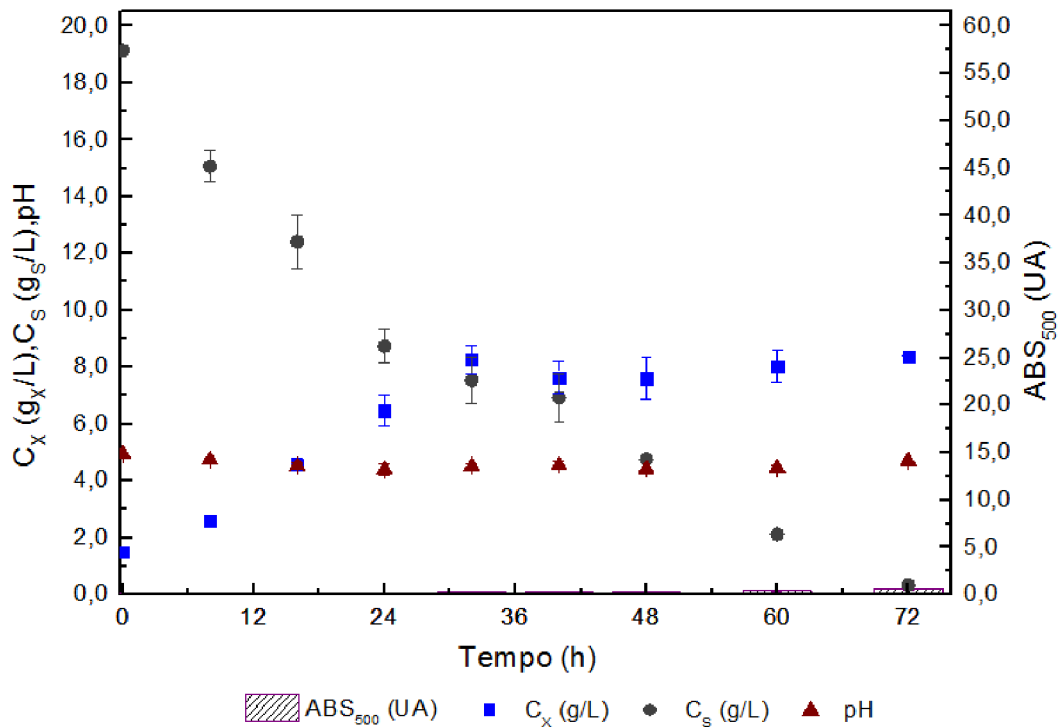
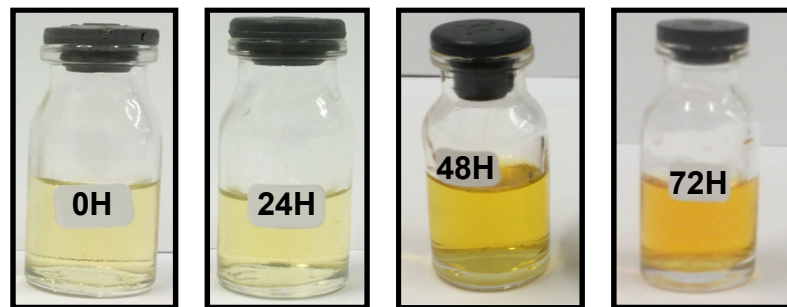


Figura 5.12 - Variações de pH, concentração de glicose (C_s), concentração de biomassa (C_x) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em frascos agitados a 32°C.



Conforme pode ser observado na Figura 5.12, verificou-se que no cultivo a 32°C são observados perfis ligeiramente diferentes dos obtidos nos cultivos a 20, 24 e 28°C (Figuras 5.9 a 5.11). No cultivo a 32°C observou-se que o pH apresentou uma leve diminuição nas primeiras 32 horas de cultivo, de 5,0 para 4,3, e manteve-se constante até o término do mesmo, caracterizado pelo esgotamento da fonte de carbono (glicose). Nesse período foi possível verificar que a biomassa apresentou crescimento exponencial com simultânea diminuição do pH, atingindo sua máxima concentração (C_X) da ordem de 8 g/L. Posteriormente, a concentração celular e o pH, mantiveram-se constantes até o final do cultivo. Quanto à produção de pigmento vermelho, verificou-se a completa ausência do mesmo no caldo de cultivo, conforme ilustrado na Figura 5.13, o que sugere que temperaturas elevadas desfavorecem a síntese de pigmento vermelho pelo fungo *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*.

Figura 5.13 - Sobrenadantes dos caldos de cultivo a 32°C em diferentes tempos de cultivo em frascos agitados.



Fonte: Acervo pessoal.

Em temperaturas mais amenas, verificou-se a ocorrência de produção com uma tendência nitidamente relacionada com a temperatura, como pode-se observar nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11, correspondentes aos cultivos a 20, 24 e 28°C, respectivamente.

Como mencionado, os cultivos a 20, 24 e 28°C apresentaram de modo geral comportamentos semelhantes. Com relação ao pH observa-se nos períodos iniciais uma tendência da diminuição do mesmo, atingindo valores próximos a 3,7, até que toda glicose fosse consumida. Após este período, os valores de pH aumentaram, tornando os caldos mais alcalinos ao final dos cultivos, isto porque, possivelmente, após o completo esgotamento da fonte de carbono, inicia-se o consumo de outros nutrientes presentes no caldo fermentativo, no caso os aminoácidos da fonte de nitrogênio (peptona), que ao serem metabolizados elevam o pH do caldo.

Coincidentemente, nos cultivos a 20, 24 e 28°C observou-se que o aumento de pH também ocorreu no mesmo período de máxima produção de pigmento, resultado este que se

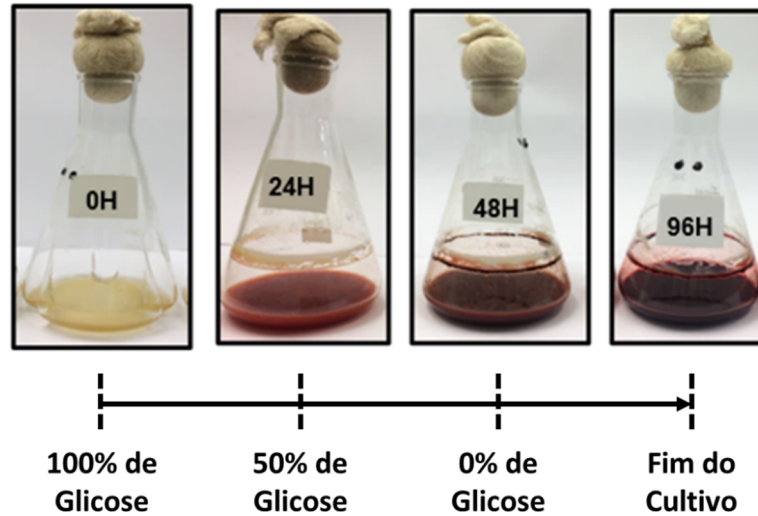
encontra em conformidade com os obtidos por MORITZ (2005), que relaciona este fato com a tendência do aumento da permeabilidade da parede celular do fungo em pH's mais alcalinos, ou seja, pH's mais elevados do meio contribuem para um aumento da permeabilidade da parede celular, facilitando assim, a passagem de pigmento acumulado no interior das células para o caldo de cultivo.

Quanto ao consumo da glicose e crescimento da biomassa, nota-se que logo nos períodos iniciais as células se encontraram em um crescimento acentuado, configurando o que se denomina de fase exponencial de crescimento. A máxima concentração celular, da ordem de 10 g/L, ocorreu nos três cultivos após o completo consumo da glicose. Verificou-se que dependendo da temperatura, a exaustão da glicose ocorreu em momentos diferentes, ou seja, em 60, 48 e 40 h, nos cultivos a 20, 24 e 28°C, respectivamente.

A diferença entre os tempos de consumo de glicose está relacionada ao fato de que quanto menor a temperatura de operação, mais lento tende a ser o metabolismo celular, levando conseqüentemente a um tempo maior para total consumo dos nutrientes, bem como, para a produção de metabólitos.

Por fim, com relação à produção de pigmento vermelho, conforme ilustrado na Figura 5.14, observou-se que nos ensaios a 20, 24 e 28°C, a produção iniciou após o consumo de aproximadamente 50% da concentração inicial de glicose, ou seja, quando as concentrações nos caldos se encontravam próximas a 10 g/L. Entretanto, embora o crescimento da biomassa tenha sido interrompido pelo completo esgotamento da glicose no caldo, a produção de pigmento manteve-se em ascensão, atingindo sua máxima concentração por volta de 24 horas após o total consumo da glicose, caracterizando-se com um metabólito secundário, o que se encontra de acordo com o relatado pela literatura em relação a pigmentos produzidos por microrganismos (CALVO et al., 2002; CARO et al., 2012; RAO; XIAO E LI, 2017).

Figura 5.14 - Análise do consumo de glicose com a síntese de pigmento ao longo do ensaio de 24°C em frascos agitados.



Fonte: Acervo pessoal.

Valores máximos de ABS_{500} (UA) de 48,17 (96 h); 52,32 (72 h) e 29,12 (72 h) foram obtidos nos cultivos a 20, 24 e 28°C, respectivamente. Observa-se, portanto, que a produção de pigmento nos cultivos a 20 e 24°C apresentaram valores praticamente iguais e estatisticamente superiores à produção obtida a 28°C, segundo resultados obtidos pelo método de Tukey (Tabela 5.2), considerando os desvios-padrão da média obtida nos cultivos em triplicata.

Tabela 5.2 - Resultado da análise estatística pelo Método de Tukey das produções de pigmento obtidas nos cultivos em frascos agitados sob diferentes temperaturas.

<i>Temperaturas de Operação</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Teste de Tukey*</i>
20°C	48,17	2,43	A
24°C	52,32	3,56	A
28°C	29,12	5,84	B

*Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Com base nos valores de absorvância a 500 nm (ABS_{500}), pode-se observar que a produção de pigmento vermelho alcançou valores elevados nos três cultivos em um período de 72 a 120 horas, sendo estes resultados extremamente significativos frente aos obtidos por

SUDHA; GUPTA E AGGARWAL (2017), sendo este um dos poucos trabalhos encontrados na literatura relacionado com a produção de pigmento por *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*, que relata uma produção máxima de 6,01 UA a 490 nm a 15°C após 20 dias de cultivo estático.

Quanto a outros tipos de linhagens, também verifica-se considerada relevância dos resultados de produção obtidos, visto que segundo a literatura, o intervalo de produção em termos de absorbância para pigmentos vermelhos obtidos por fungos filamentosos variam de 2,0 a 26,0 UA (DA COSTA E VENDRUSCOLO, 2017; MEINICKE, 2008; OLIVEIRA; BARBIERI E EBINUMA, 2017).

5.4 CULTIVOS EM BIORREATOR DE BANCADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS

De forma a validar os resultados obtidos em frascos agitados, foram realizados cultivos submersos em biorreatores de 4 L de capacidade útil a 400 rpm e 0,5 vvm, nas temperaturas de 20, 24 e 28°C, avaliando a influência da temperatura sobre o consumo de glicose (C_s), crescimento celular (C_x), produção de pigmento (ABS_{500}) e pH. Pelo fato de não ter sido detectada produção de pigmento a 32°C em frascos agitados, esta condição de cultivo não foi reproduzida em biorreator.

Os resultados dos cultivos estão ilustrados nas Figuras de 5.15 a 5.17.

Figura 5.15 - Variações de pH, concentração de glicose (C_s), concentração de biomassa (C_x) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em biorreator a 20°C.

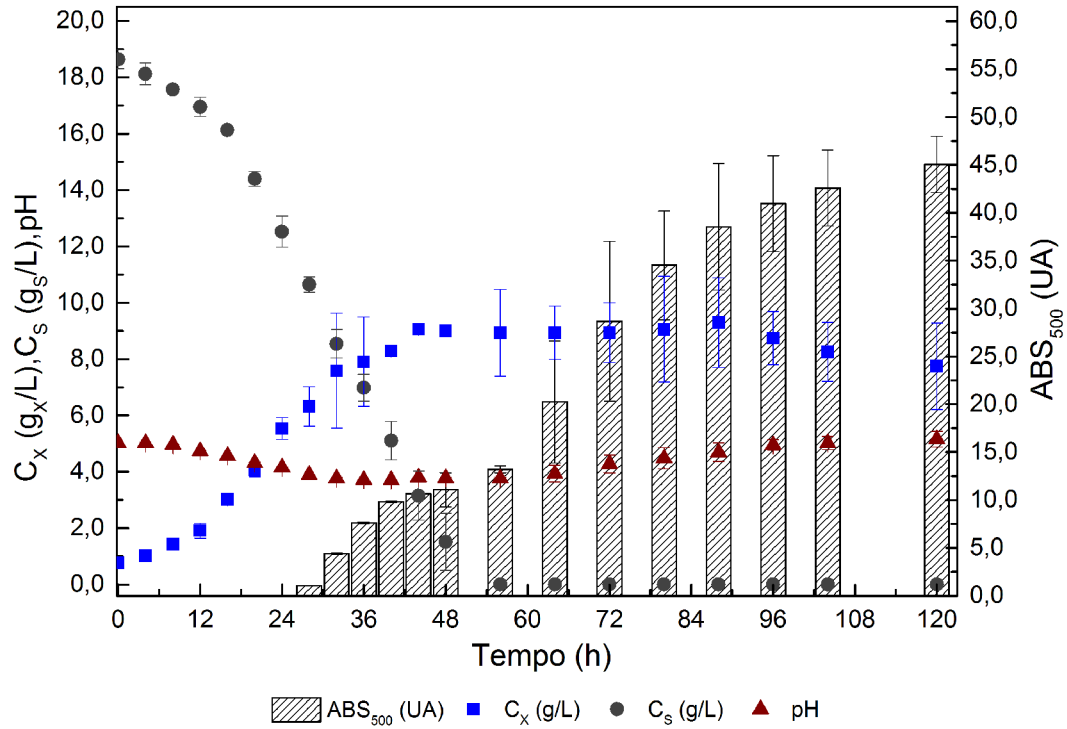


Figura 5.16 - Variações de pH, concentração de glicose (C_s), concentração de biomassa (C_x) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em biorreator a 24°C.

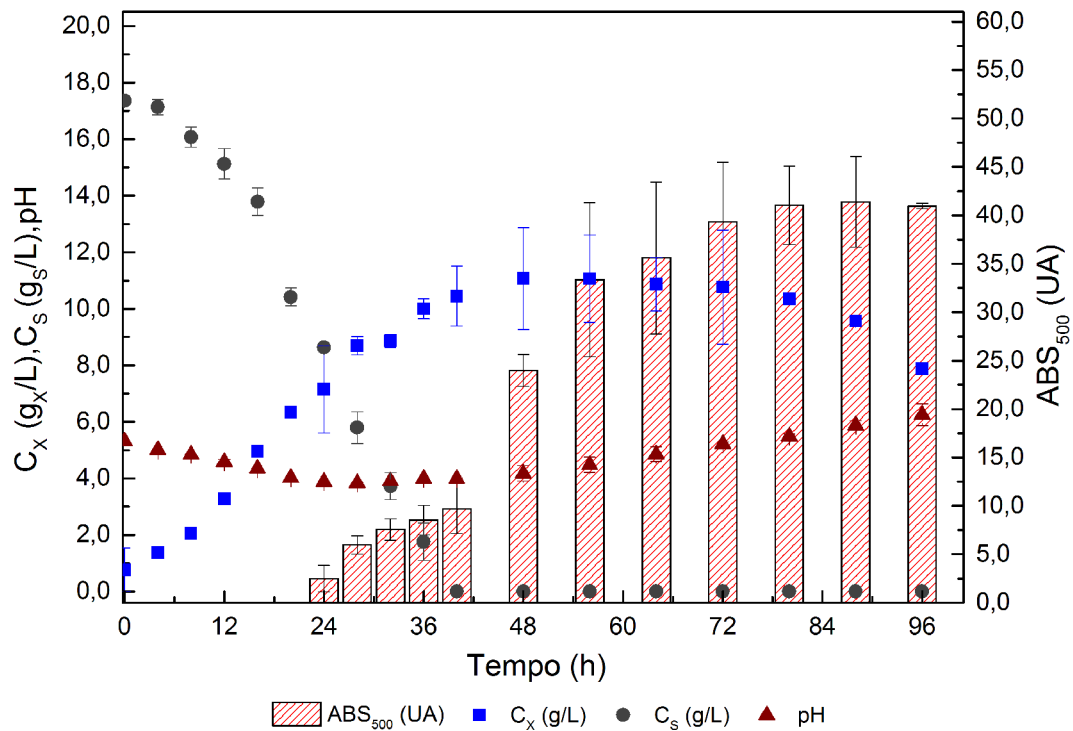
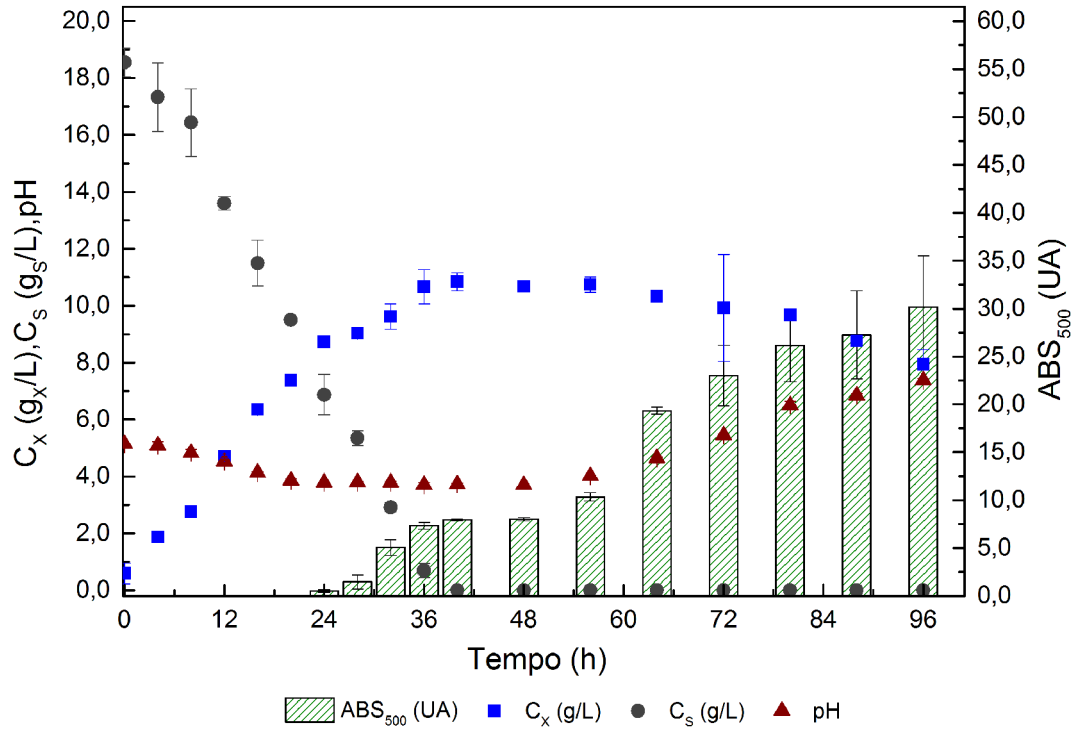


Figura 5.17- Variações de pH, concentração de glicose (C_s), concentração de biomassa (C_x) e produção de pigmento (ABS_{500}) obtidas no cultivo em biorreator a 28°C.



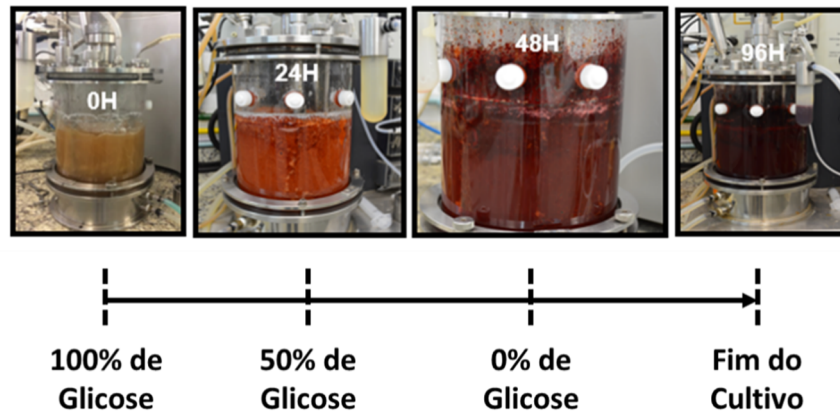
Observando-se as Figuras 5.15 a 5.17, verifica-se que os resultados obtidos nos cultivos em biorreator apresentaram perfis similares àqueles obtidos em frascos agitados.

Dependendo da temperatura, a exaustão da glicose ocorreu em momentos diferentes, ou seja, em 54, 40 e 40 h, respectivamente nos cultivos a 20, 24 e 28°C. Quanto ao crescimento celular, valores máximos de concentração celular em torno de 9,5 g/L foram obtidos nos três cultivos ao término da concentração de glicose. Observa-se também a existência de uma fase estacionária de crescimento mais prolongada, provavelmente devido a uma melhor transferência de oxigênio, visto que a distribuição de oxigênio em biorreatores tende a ser mais efetiva, o que acarreta em um maior suprimento de oxigênio ao microrganismo, resultando assim, em um aumento de sua viabilidade metabólica, bem como, em uma melhora dos processos de transferência de quantidade de movimento, calor e massa no sistema (SANTOS-EBINUMA, 2013).

Com relação à produção de pigmento vermelho, conforme ilustra Figura 5.18, observou-se que nos cultivos em biorreator, a produção iniciou com concentrações de glicose abaixo de 10 g/L. Novamente, embora o crescimento da biomassa tenha sido interrompido pelo completo esgotamento da glicose no caldo, a produção de pigmento manteve-se em ascensão

até o término dos cultivos, caracterizando-se como um metabólito secundário.

Figura 5.18 - Análise do consumo de glicose com a síntese de pigmento ao longo do Ensaio de 24°C em biorreator.



Fonte: Acervo pessoal.

Observa-se que nos cultivos em biorreator também foram obtidas produções de pigmento vermelho extremamente superiores, cerca de 7,5 vezes maiores que a obtida por SUDHA; GUPTA E AGGARWAL (2017).

Valores máximos de ABS_{500} (UA) de 45,05 (120 h); 41,40 (96 h) e 30,16 (96 h) foram obtidos nos cultivos a 20, 24 e 28°C, respectivamente. Novamente, a produção de pigmento foi similar nos cultivos a 20 e 24°C e estatisticamente superiores à produção obtida a 28°C (Tabela 5.3), considerando os desvios-padrão da média obtida nos cultivos em duplicata.

Tabela 5.3 - Análise estatística dos cultivos em biorreatores sob diferentes temperaturas via Método de Tukey.

<i>Temperaturas de Operação</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Teste de Tukey*</i>
20°C	45,053	2,954	A
24°C	41,398	0,299	A
28°C	30,156	5,375	B

*Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significantes ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

5.5 DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA (ABS₅₀₀) E CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTO

Com base nas amostras de caldo tratado a 20°C, após a obtenção das concentrações de sólidos solúveis totais do caldo final tratado (C_{SSCT}) e das frações finais obtidas aos finais dos três procedimentos de extração empregados considerando os sólidos como sendo o pigmento extraído (C_{PE}) em g/L e das respectivas absorbâncias a 500 nm (ABS₅₀₀) dessas amostras (item 4.9), realizou-se o ajuste de um modelo linear de ABS₅₀₀ em função de C_{SSCT} ou C_{PE} aos dados experimentais.

No Procedimento 1, a etapa de se reduzir o pH antes da primeira extração do pigmento do caldo com acetato de etila levou à formação de um corpo suspenso geleificado na fase orgânica (acetato de etila) contendo o pigmento, não sendo possível extraí-lo novamente para o n-butanol.

As Figuras 5.19 a 5.21 ilustram os resultados dos ajustes obtidos do Caldo Tratado (CT) e dos Procedimentos 2 e 3.

Figura 5.19 - Ajuste do modelo linear aos dados experimentais de ABS₅₀₀ em função da concentração de sólidos solúveis no Caldo Tratado (C_{SSCT}).

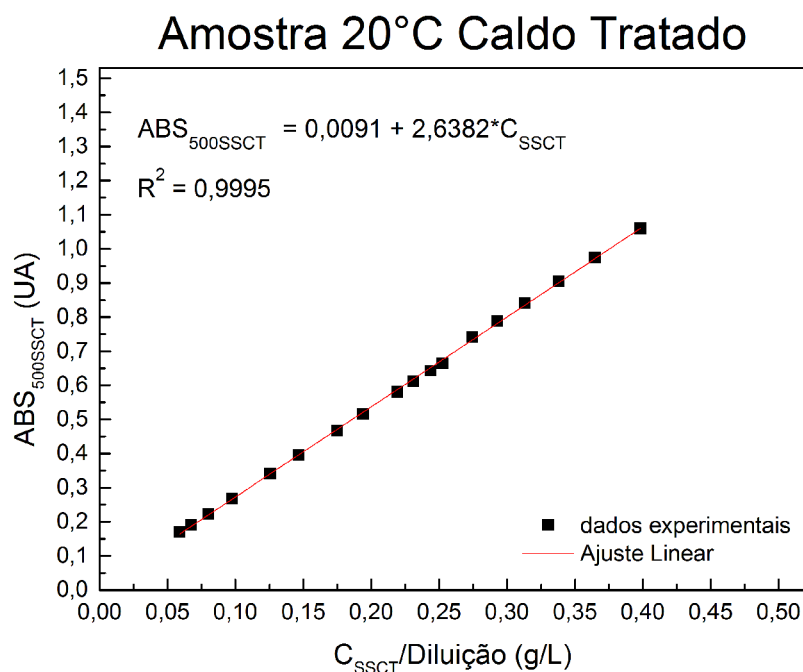


Figura 5.20 - Ajuste do modelo linear aos dados experimentais de ABS_{500} em função da concentração de pigmento extraído (C_{PE}) referente ao Procedimento 2.

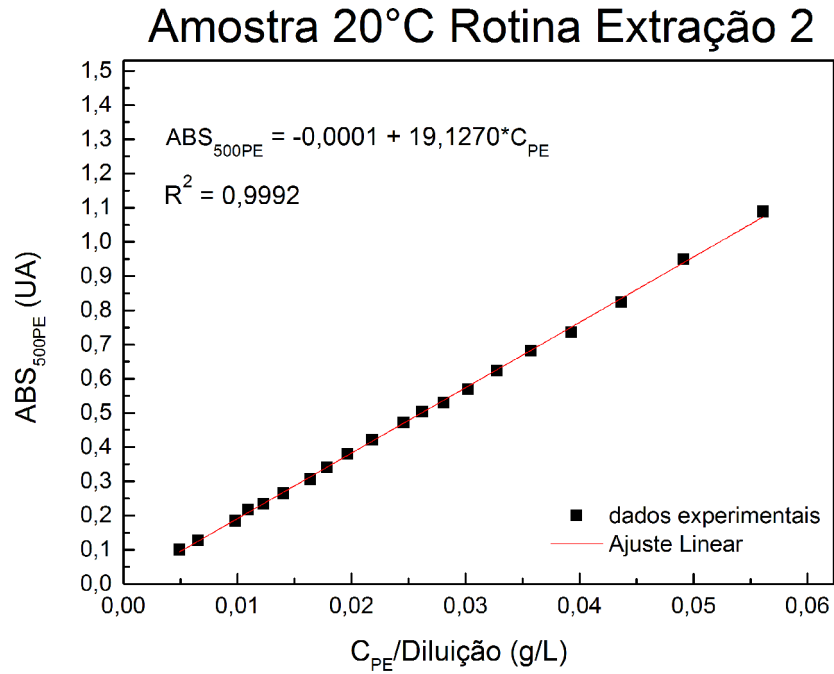
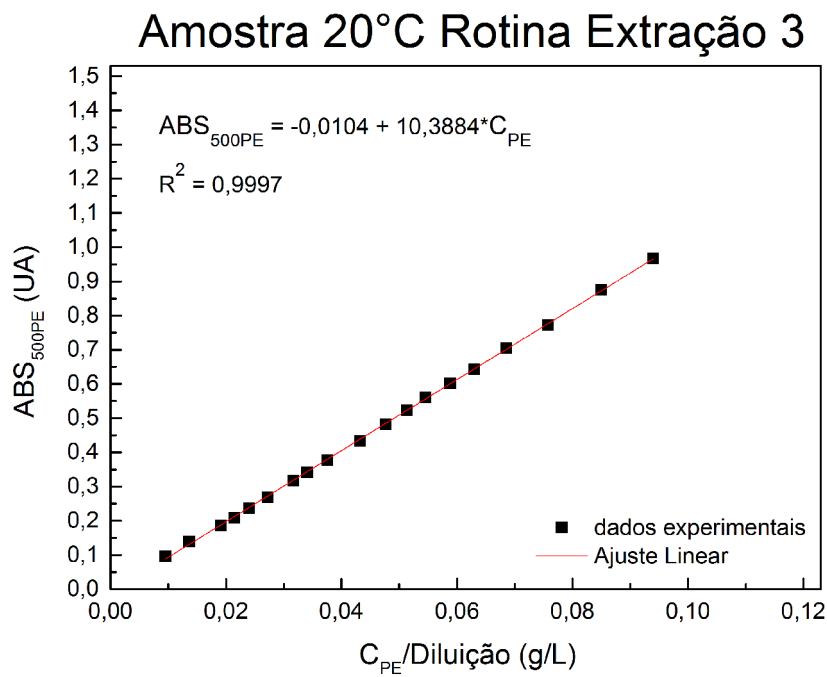


Figura 5.21 - Ajuste do modelo linear aos dados experimentais de ABS_{500} em função da concentração de pigmento extraído (C_{PE}) referente ao Procedimento 3.



Pelos coeficientes angulares das retas de regressão obtidas para os três casos, pode-se observar que, para um mesmo valor de concentração, seja de sólidos solúveis totais no caldo tratado (C_{SSCT}) ou do pigmento extraído nas frações de n-butanol oriundas dos Procedimentos 2 e 3 (C_{PE2} e C_{PE3}), os valores de absorvância (ABS_{500}) apresentam a seguinte relação, o que se traduz num aumento de pureza das soluções:

$$ABS_{500}(CT) < ABS_{500}(\text{Procedimento 3}) < ABS_{500}(\text{Procedimento 2})$$

Os valores dos coeficientes lineares obtidos por meio dos ajustes, juntamente com os dados de absorvância e de concentração de pigmento em g/L nas amostras originais foram correlacionados conforme descrito no item 4.9, de modo a se obter as equações 29 e 30, correspondentes as relações diretas entre as absorvâncias do caldo tratado (ABS_{SSCT}) e a concentração de pigmento extraído (C_{PE}) nos procedimentos de extração 2 e 3, respectivamente.

$$C_{PE2} \text{ (g/L)} = 0,08470 \cdot ABS_{500-CT} \cdot \text{diluição} \quad (29)$$

$$C_{PE3} \text{ (g/L)} = 0,16549 \cdot ABS_{500-CT} \cdot \text{diluição} \quad (30)$$

Conhecendo-se os volumes e as concentrações de pigmento no caldo tratado original e nas frações finais de n-butanol (equações 29 e 30), foram calculadas as eficiências de recuperação de pigmento (ER em %), bem como, a porcentagem de pigmento presente no caldo tratado original (PCTO em %), pelas equações 9 e 10, respectivamente (Tabela 5.4), com o intuito de estabelecer a metodologia de extração para as amostras de 24 e 28°C.

Tabela 5.4 - Comparação entre as eficiências de recuperação (ER em %) e a porcentagem de pigmento presente no caldo tratado original (PCTO em %) dos procedimentos de extração testados.

Experimento 20°C		
	Procedimento 2	Procedimento 3
V_{CT} (mL)	200	200
C_{SSCT} (g/L)	8,79	8,79
ABS_{500-CT} (UA)	23,76	23,76
C_{PCT} (g/L)	2,01	3,93
V_{NB} (mL)	100	100
C_{PE} (g/L)	1,97	3,84
ER (%)	48,8	48,8
PCTO (%)	0,11	0,22

* V_{CT} : volume de caldo tratado; C_{SSCT} : concentração de sólidos solúveis do caldo tratado; ABS_{500-CT} : absorvância do caldo tratado; C_{PCT} : concentração de pigmento no caldo tratado; V_{NB} : volume de n-butanol; C_{PE} : concentração de pigmento extraído; ER (%):eficiências de recuperação; PCTO (%):porcentagem de pigmento presente no caldo tratado original.

Conforme mostrado na Tabela 5.4, os dois métodos de extração apresentaram valores de eficiência de recuperação (ER) praticamente iguais, o que mostra que as alterações de pH podem ter afetado a pureza da extração, mas não a eficiência de recuperação do pigmento. Com base nas ERs obtidas e em critérios qualitativos observados no decorrer dos processos de extração, conforme ilustram as Figuras 5.22 e 5.23, o procedimento de extração 3 foi empregado na recuperação do pigmento nas amostras dos caldos tratado de 24 e 28°C, obtendo-se ao final do processo as relações expressas pelas equações 30, 31 e 32, correspondentes às temperaturas de 20, 24 e 28°C, respectivamente.

$$C_{PE-20^{\circ}C} (g/L) = 0,16549 \cdot ABS_{500-CT} \cdot diluição \quad (30)$$

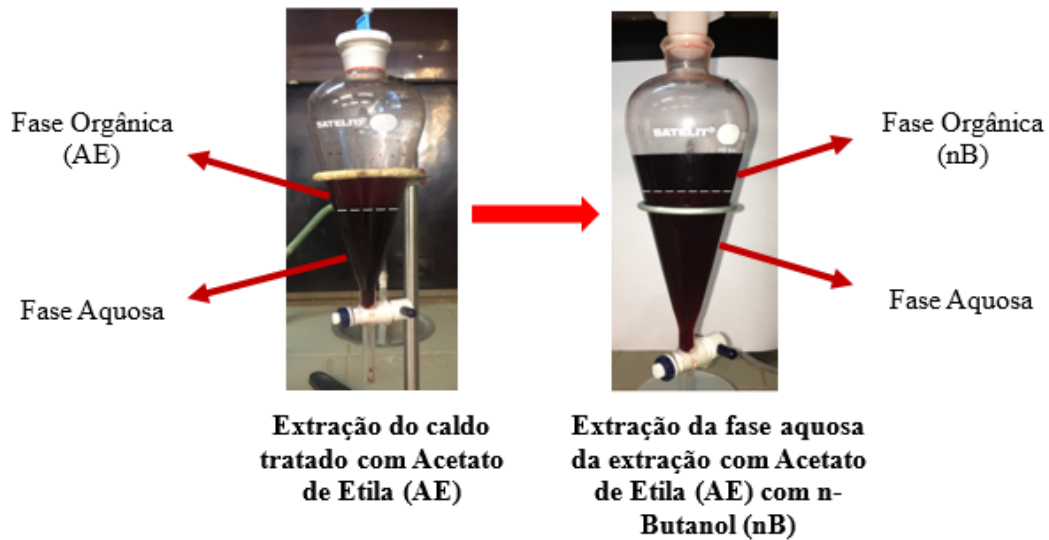
$$C_{PE-24^{\circ}C} (g/L) = 0,19488 \cdot ABS_{500-CT} \cdot diluição \quad (31)$$

$$C_{PE-28^{\circ}C} (g/L) = 0,16781 \cdot ABS_{500-CT} \cdot diluição \quad (32)$$

As Figuras 5.22 e 5.23 ilustram os Procedimentos de Extração 2 e 3, respectivamente:

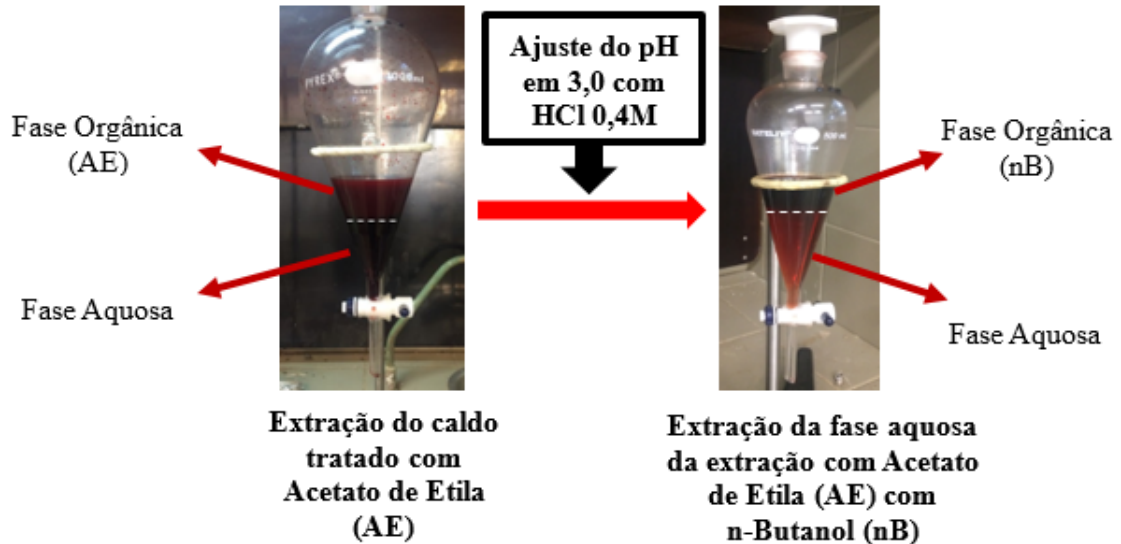
Figura 5.22- Ilustração do Procedimento de Extração 2.

Rotina de Extração 2



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 5.23- Ilustração do Procedimento de Extração 3.

Rotina de Extração 3

Fonte: Acervo pessoal.

A partir da obtenção das equações 30, 31 e 32 foi possível expressar os dados de produção de pigmento em termos de concentração (C_P em g/L). Desta forma, foi possível obter variáveis importantes do bioprocessamento como produção máxima de pigmento (C_{Pmax} em g/L) e as produtividades em produto (pigmento) volumétrica (P_P em $g/L.h$) e específica ($P_{P/X}$ em $g/g_X.h$). Valores de produtividade volumétrica em produto (P_P em $g/L.h$) permitem a obtenção de uma produção temporal (diária, por exemplo) de produto, conhecendo-se o volume do biorreator e eficiência de recuperação (ER em %). A produtividade específica ($P_{P/X}$ em $g/g_X.h$) é um termo relacionado com a capacidade das células em sintetizarem um determinado produto ao longo do tempo. Caso $P_{P/X}$ seja baixa, deve-se avaliar condições de cultivo que aliem alto crescimento celular com alta produtividade específica, de modo a se obter alta produtividade volumétrica.

Os gráficos das Figuras 5.24 e 5.25 ilustram as variações de P_P e $P_{P/X}$ ao longo dos cultivos a 20, 24 e 28°C em frascos agitados e em biorreator.

Figura 5.24- Variações das produtividades em pigmento volumétrica (P_P em $g_P/L.h$) (A) e específica ($P_{P/X}$ em $g_P/g_X.h$) ao (B) longo dos cultivos a

20 (●), 24 (●) e 28°C (●) em frascos agitados.

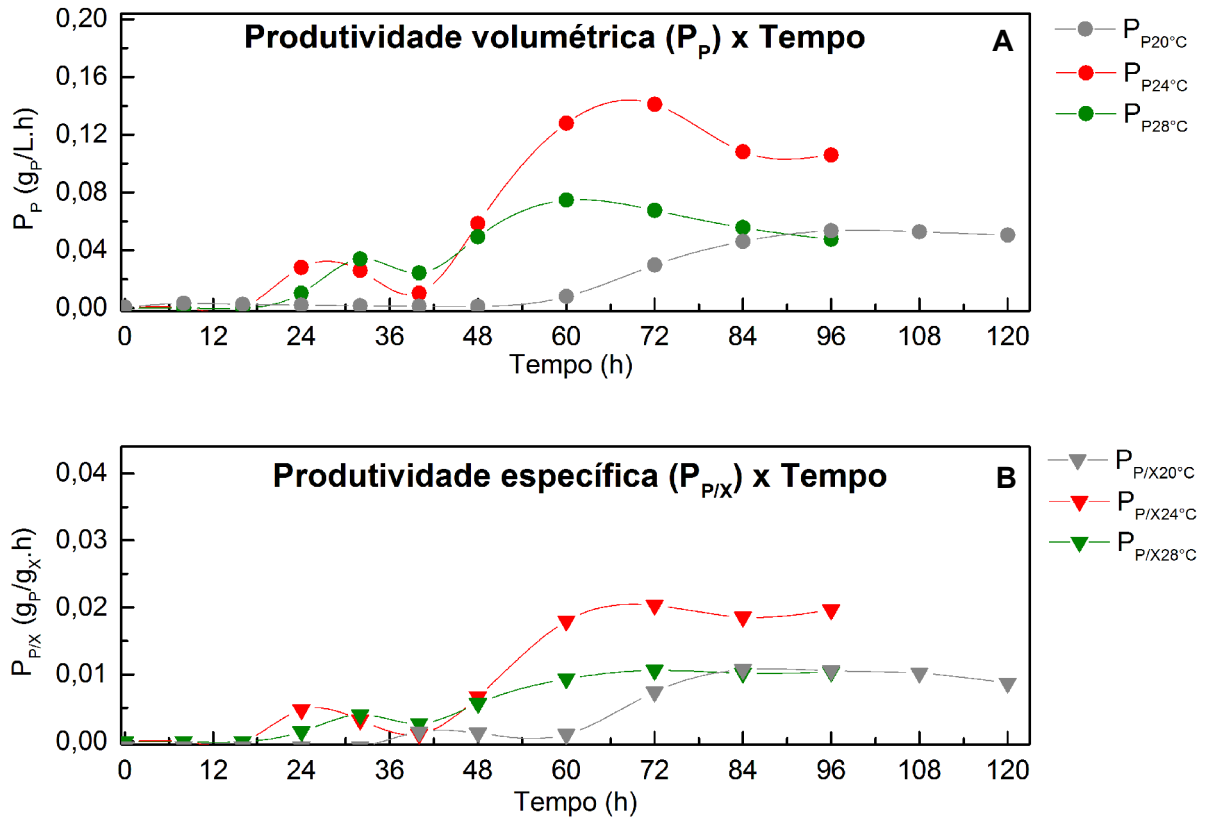
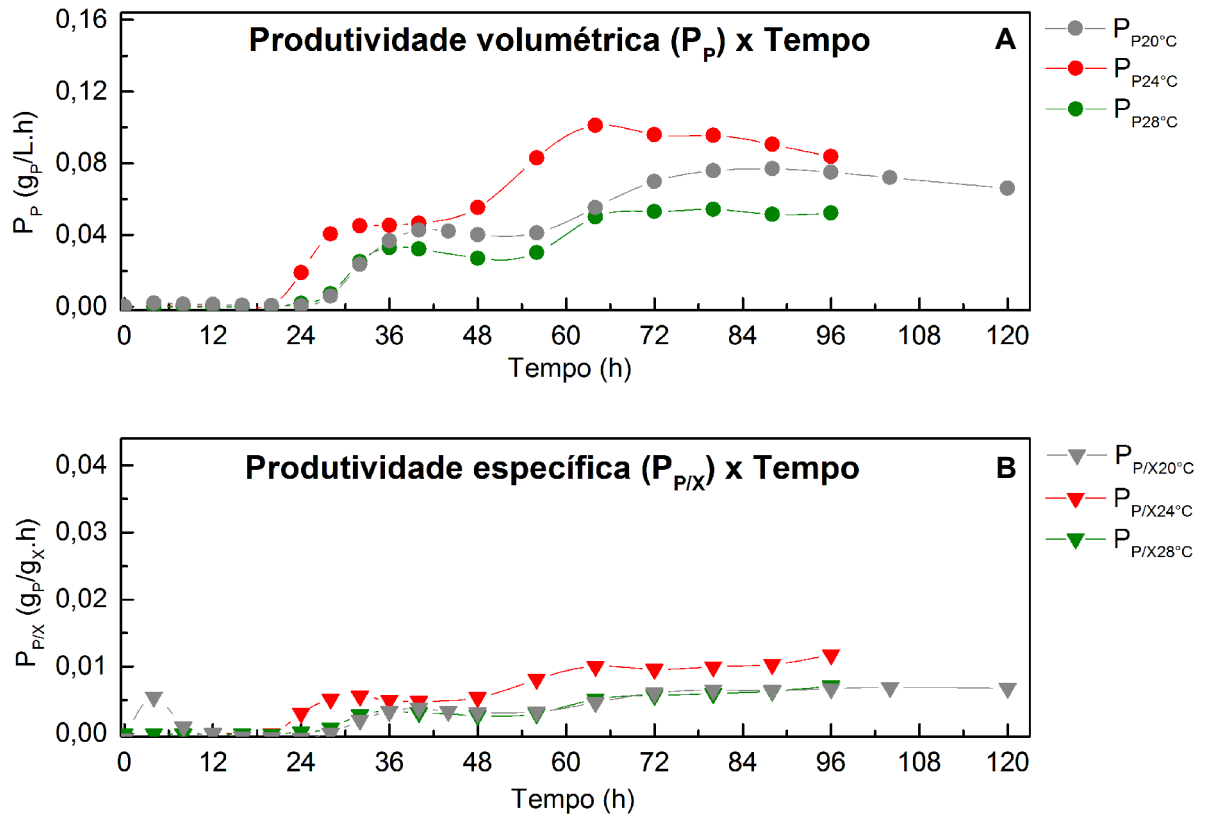


Figura 5.25- Variações das produtividades em pigmento volumétrica (P_P em $\text{g}_P/\text{L}\cdot\text{h}$) (A) e específica ($P_{P/X}$ em $\text{g}_P/\text{g}_X\cdot\text{h}$) ao (B) longo dos cultivos a

20 (●), 24 (●) e 28°C (●) em biorreator.



Tanto nos cultivos em frascos agitados como nos realizados em biorreator, observa-se que os maiores valores tanto de P_P quanto de $P_{P/X}$ foram obtidos nos cultivos a 24°C, seguidos daqueles obtidos a 20 e a 28°C, respectivamente. Outro ponto que deve ser destacado é que os valores de P_P e $P_{P/X}$ foram superiores nos ensaios em frascos agitados, independentemente da temperatura de cultivo, possivelmente devido ao fato de as condições de operação dos biorreatores ainda requererem estudos de otimização.

Os gráficos das Figuras 5.26 e 5.27 apresentam uma síntese dos cultivos em frascos agitados e em biorreator, onde os principais parâmetros de desempenho em termos de produção de pigmento, quais sejam, concentração máxima (C_{Pmax} em g_P/L) e produtividade volumétrica máxima em pigmento (P_{Pmax} em $\text{g}_P/\text{L}\cdot\text{h}$) podem ser comparados.

Figura 5.26 - Concentração máxima (C_{Pmax} em g_p/L) e produtividade volumétrica máxima em pigmento (P_{Pmax} em $g_p/L.h$) em função da temperatura obtidas nos cultivos em frascos agitados.

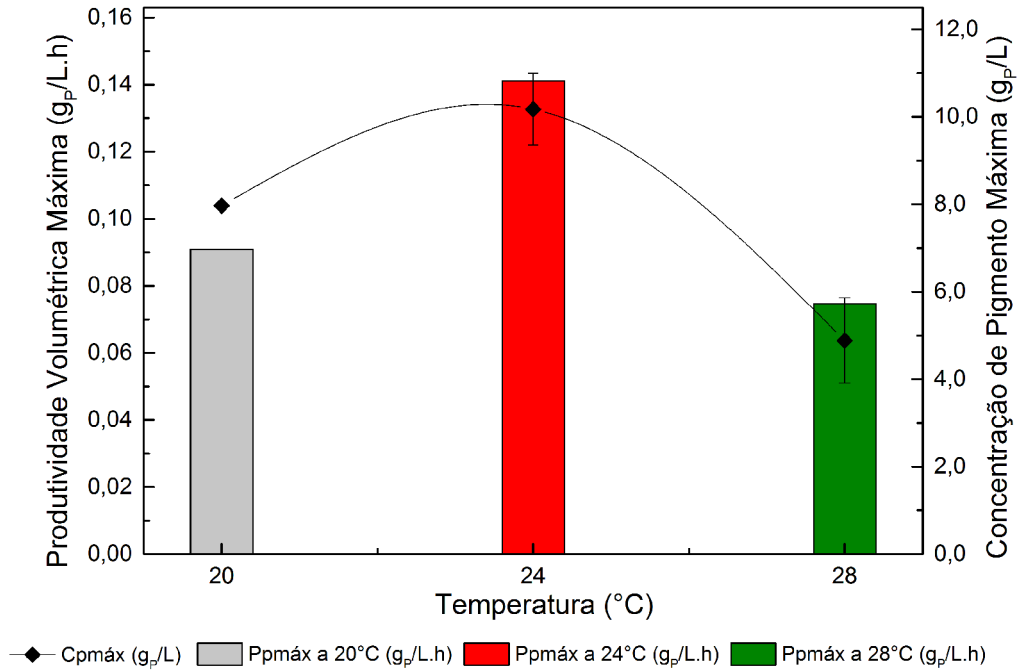
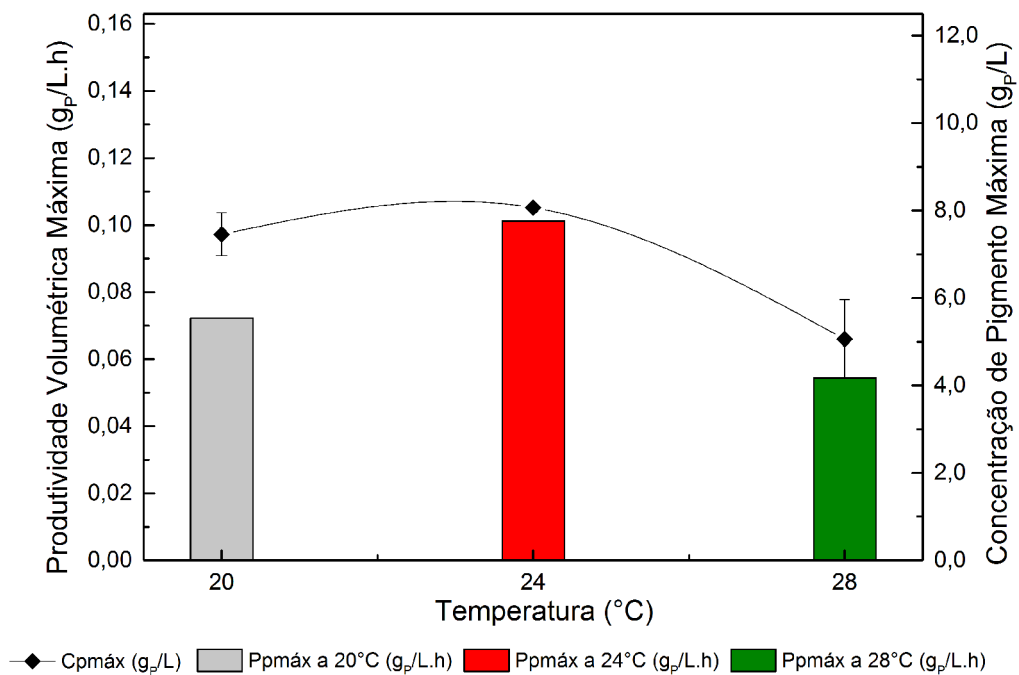


Figura 5.27 - Concentração máxima (C_{Pmax} em g_p/L) e produtividade volumétrica máxima em pigmento (P_{Pmax} em $g_p/L.h$) em função da temperatura obtidas nos cultivos em biorreatores.

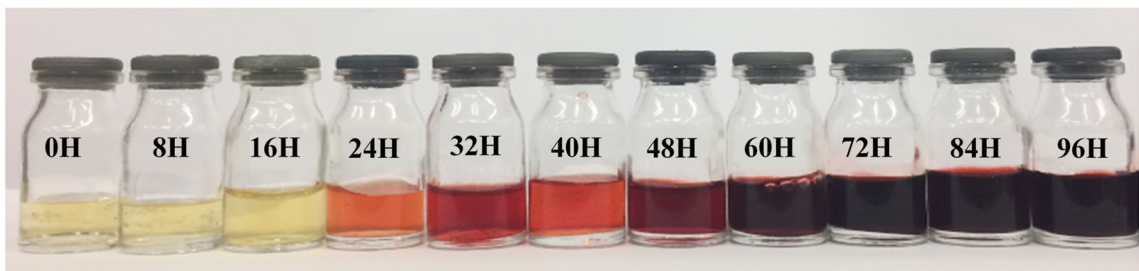


Observa-se na Figura 5.26 referentes aos resultados em frascos agitados, que a máxima concentração de pigmento foi de 10,20 gp/L correspondente a ABS_{500max} de 52,32 UA, bem como a produtividade volumétrica máxima em produto de 0,141 gp/L.h, obtidas a 24°C.

Dos resultados dos cultivos em biorreator (Figura 5.27) observa-se que a máxima concentração de pigmento de 8,07 gp/L correspondente a ABS_{500max} de 41,40 UA e a produtividade volumétrica máxima em produto de 0,101 gp/L.h, foram obtidas também a 24°C.

Constata-se, portanto, que os maiores valores de C_{Pmax} e P_{Pmax} foram obtidos a 24°C tanto em frascos agitados quanto em biorreator, sendo obtidos valores pouco superiores em frascos agitados, o que sugere ser esta temperatura a mais favorável à produção de pigmento vermelho pelo fungo endofítico *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*, como mostra Figura 5.28.

Figura 5.28 - Escala de cores obtida no Ensaio a 24°C em frascos agitados.



Fonte: Acervo pessoal.

Vale ressaltar que, assim como os resultados em termos de ABS_{500} (UA), os resultados convertidos em concentração em g/L mostraram-se também expressivos quando comparado aos trabalhos de MÉNDEZ et al. (2011) e CHO et al. (2002a), que obtiveram respectivamente uma produção de pigmentos vermelhos por *Penicillium purpurogenum* e por *Paecilomyces sinclairii* de 2,50 e 4,73g/L, respectivamente.

5.6 MODELAGEM CINÉTICA DO BIOPROCESSO – AJUSTE E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS

Modelagem cinética A

Com base nos resultados experimentais obtidos, foi proposta a modelagem cinética A do bioprocesso utilizando o modelo cinético de crescimento de Contois e assumindo como hipóteses a glicose como único substrato limitante, a ocorrência de morte celular ao longo de todo o bioprocesso e o pigmento como sendo um produto não associado ao crescimento,

conforme descrito na seção 4.10.

De modo a determinar os parâmetros cinéticos do modelo proposto, primeiramente calculou-se a velocidade máxima de crescimento celular (μ_{max}) por meio da equação 11. Na sequência realizou-se o ajuste do modelo aos pontos experimentais, otimizando os parâmetros cinéticos do modelo.

As Figuras 5.29 a 5.31 ilustram o ajuste do modelo aos valores experimentais de C_S , C_X e C_P obtidos nos cultivos a 20, 24 e 28°C, respectivamente.

Figura 5.29 - Gráfico comparativo entre os valores simulados pelo modelo A (—) e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 20°C.

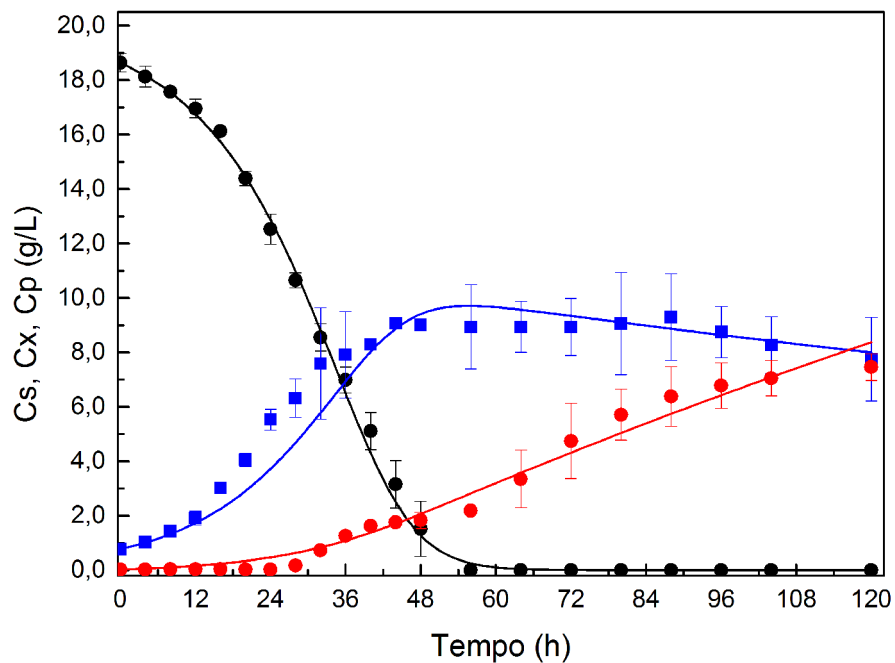


Figura 5.30- Gráfico comparativo entre os valores simulados pelo modelo A (—) e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 24°C.

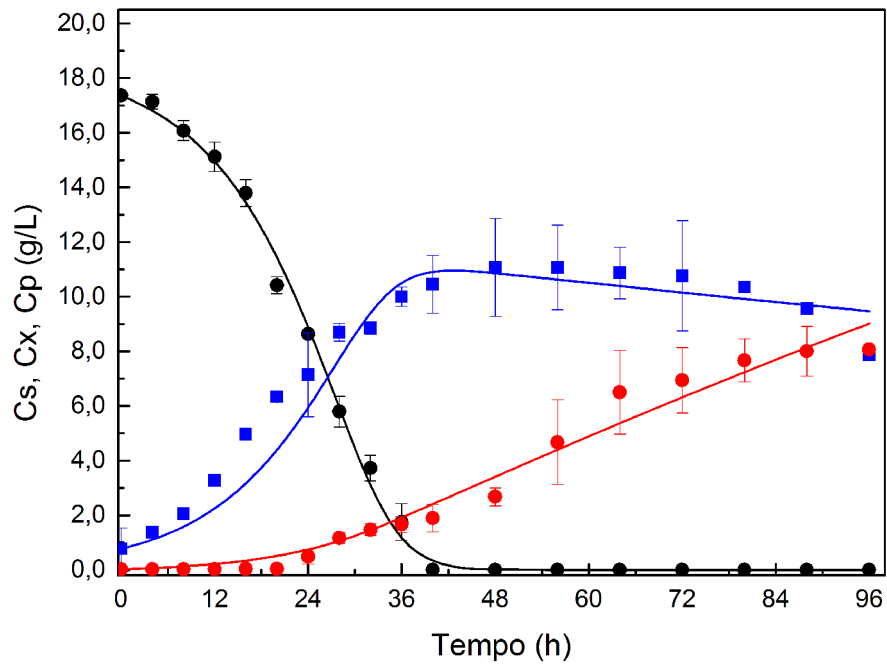
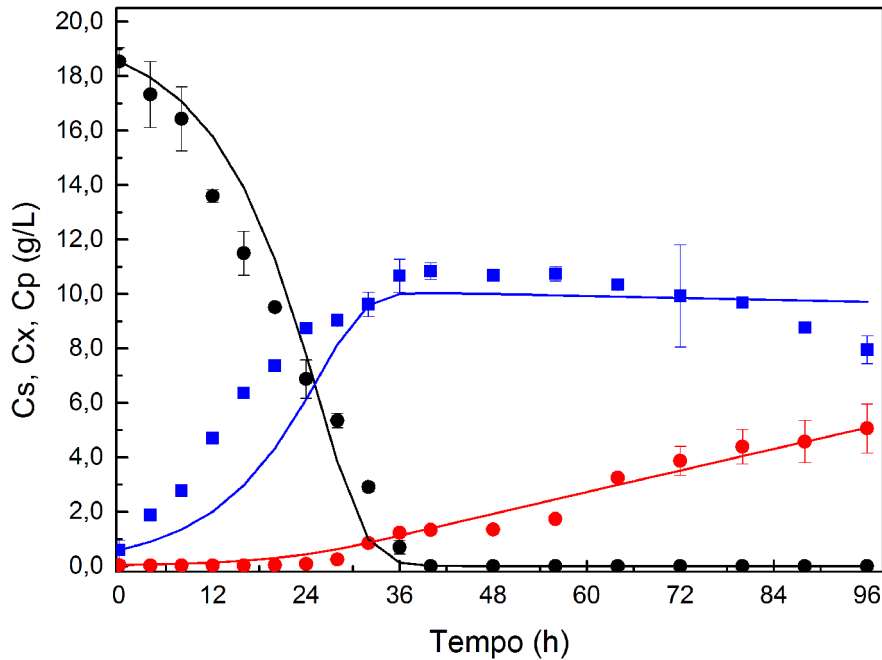


Figura 5.31- Gráfico comparativo entre os valores simulados pelo modelo A (—) e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 28°C.



Pelas Figuras 5.29 a 5.31, pode-se constatar que o modelo descreveu razoavelmente bem o comportamento do bioprocesso nas três temperaturas estudadas. No entanto, observou-se uma certa discrepância entre os valores simulados e experimentais. Com relação à concentração de pigmento (C_P), após 64 h de cultivo observa-se uma relação linear com o tempo para os valores simulados nos três ensaios realizados. Entretanto, de forma geral, o modelo de produção não associado ao crescimento mostrou-se adequado para descrever o bioprocesso, uma vez que a produção efetiva ocorreu na fase estacionária, após o crescimento exponencial das células, não estando relacionado a velocidade de consumo de substrato e crescimento celular.

De modo a sintetizar as informações do ajuste obtido, na Tabela 5.5 são apresentados valores dos parâmetros cinéticos estimados pelo ajuste do modelo A.

Tabela 5.5 - Valores estimados dos parâmetros cinéticos para os cultivos de *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* visando a produção de pigmento vermelho em biorreator a 20, 24 e 28°C (Modelagem A).

Parâmetros Cinéticos	20°C	24°C	28°C
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,0741± 0,0043	0,0953± 0,0021	0,105± 0,007
$Y_{X/S}$ (gx/gs)	0,537 ± 0,007	0,631 ± 0,008	0,517 ± 0,012
K_{SX} (gs/gx)	0,621 ± 0,030	0,424 ± 0,025	0,362 ± 0,049
k_m (h ⁻¹)	0,00327 ± 0,00025	0,00287 ± 0,00031	0,00061 ± 0,00050
β (gp/gx-h)	0,00977 ± 0,00014	0,0115 ± 0,0002	0,00667 ± 0,00029

Obs: os valores dos desvios-padrão foram obtidos considerando intervalo de confiança de 99%.

Com base nos valores mostrados na Tabela 5.5, verificou-se que os parâmetros μ_{\max} e $Y_{X/S}$ obtidos estão na faixa de valores reportados na literatura para diferentes gêneros fúngicos, podendo variar de 0,017 a 0,20 h⁻¹ e 0,245 a 0,83 g_x/g_s, respectivamente (BÜHLER et al., 2013; DA COSTA E VENDRUSCOLO, 2017; GOUDAR E STREVETT, 1998; MUSAALBAKRI et al., 2006).

Além disso, observou-se que a velocidade específica de crescimento (μ_{\max}) tendeu a aumentar com o aumento de temperatura. Enquanto que as constantes de Contois (K_{SX}) e de morte celular (k_m) tenderam a diminuir com o aumento de temperatura.

Outro ponto importante observado foi que os valores da constante de morte celular (k_m) foram baixos para os três cultivos. Entretanto, ainda que denominado como constante de “morte celular”, na verdade trata-se de uma constante de “desintegração celular”, uma vez que após o término de nutrientes, embora os sólidos insolúveis presentes no caldo sejam quantificados como células, muitas delas já se encontram mortas ou não viáveis. Ou seja, o parâmetro k_m , embora baixo, não implica que a biomassa presente manteve-se viável e produtiva durante quase todo o processo fermentativo, apenas expressa a existência do processo de desintegração celular após decorrido cerca de 80% do tempo de cultivo.

Por fim, com relação ao parâmetro de produção β correspondente a formação de produto, observou-se que o mesmo assumiu seu maior valor exatamente a temperatura de 24°C, na qual obteve-se experimentalmente os melhores resultados de produção de pigmento vermelho pelo fungo *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*.

Modelagem cinética B

Como uma segunda proposta de modelagem que representasse o comportamento cinético do bioprocesso, a modelagem B foi realizada baseando-se em uma cinética de primeira ordem e utilizando o modelo de Contois, como o modelo cinético de crescimento celular. Além disso, para a realização da mesma se estabeleceu que o crescimento celular estaria diretamente associado ao consumo da fonte de carbono, com a morte celular ocorrendo ao longo de todo bioprocesso, e com relação à produção de pigmento, se pressupôs que o microrganismo ao consumir a fonte de nitrogênio (peptona), sintetiza um precursor que conforme vai sendo gerado, as células o convertem em pigmento.

Sendo assim mediante as hipóteses estabelecidas, realizou-se o ajuste desse modelo aos dados experimentais de C_X , C_S e C_P obtidos nos cultivos a 20, 24 e 28°C, conforme ilustram as Figuras 5.32, 5.33 e 5.34, respectivamente.

Figura 5.32 - Gráfico comparativo entre os valores simulados de C_X (—), C_S (—), C_P (—), C_{PR} (—) e C_{FN} (—) pelo modelo B e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 20°C.

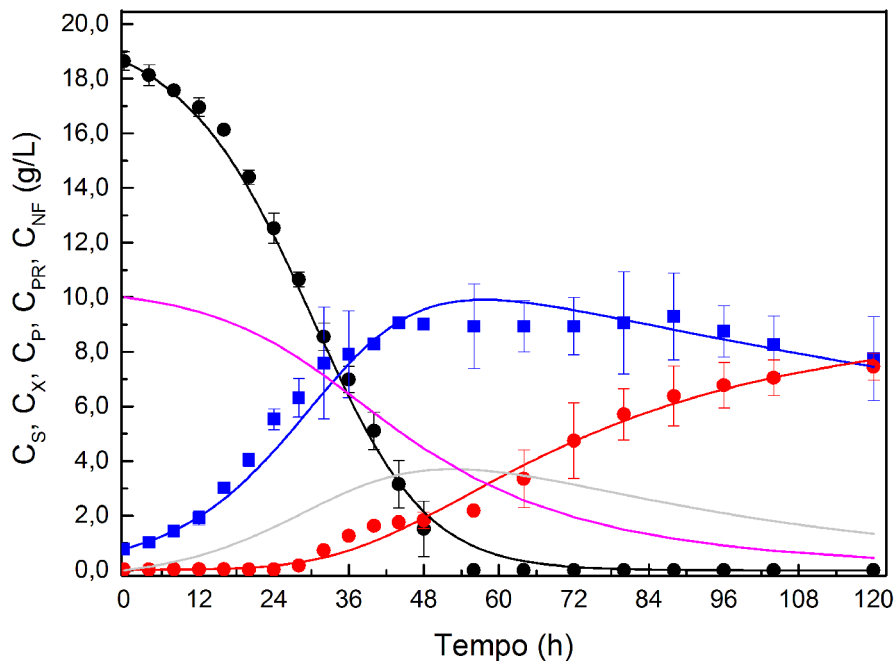


Figura 5.33 - Gráfico comparativo entre os valores simulados de C_X (—), C_S (—), C_P (—), C_{PR} (—) e C_{FN} (—) pelo modelo B e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 24°C.

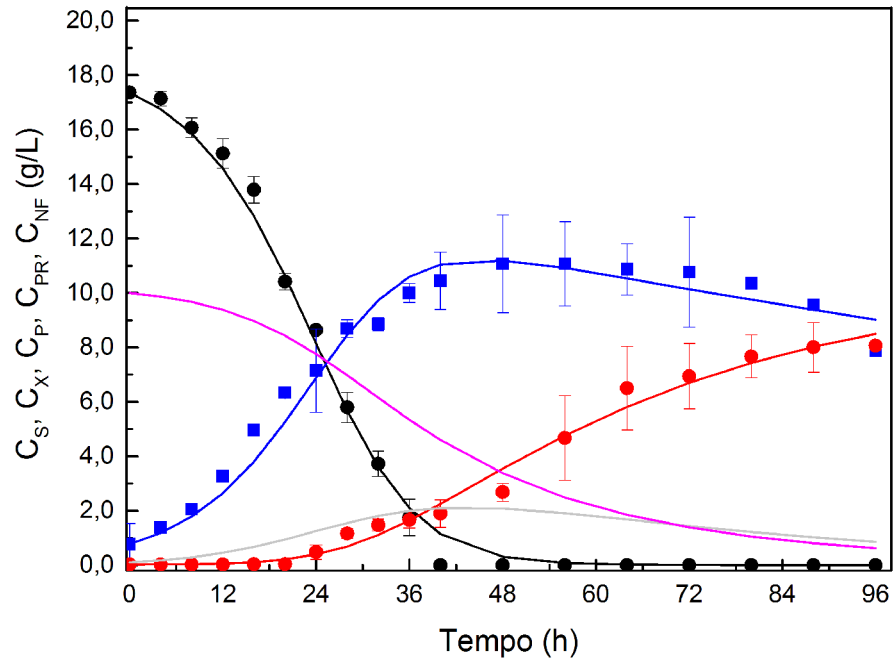
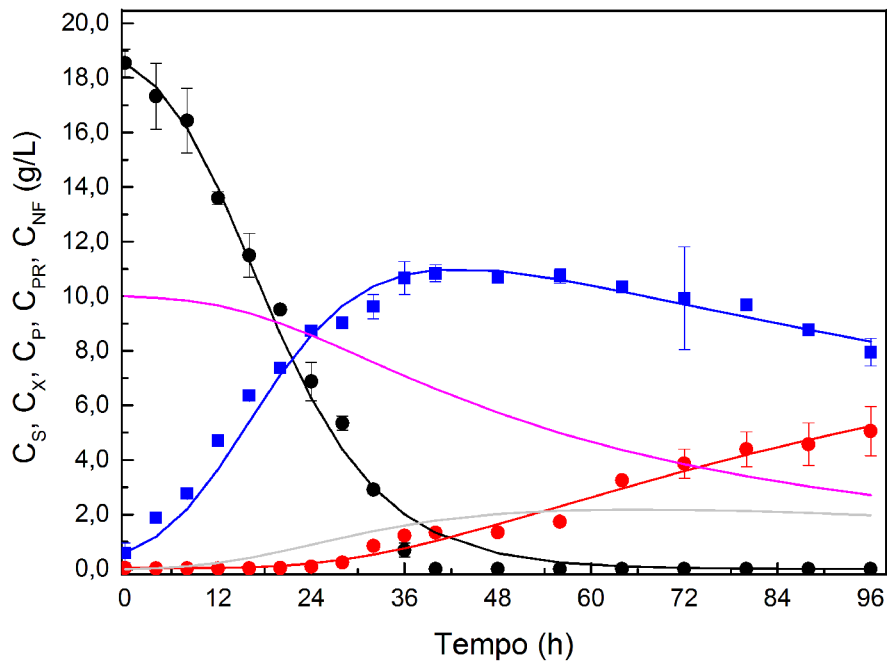


Figura 5.34 - Gráfico comparativo entre os valores simulados de C_X (—), C_S (—), C_P (—), C_{PR} (—) e C_{FN} (—) pelo modelo B e experimentais de C_X (■), C_S (●) e C_P (●) relativos ao cultivo em batelada conduzido em biorreator a 28°C



Observando-se as Figuras 5.32 a 5.34, pode-se constatar o excelente ajuste do modelo B aos valores experimentais de C_S , C_X e C_P dos cultivos a 20, 24 e 28°C, mostrando que o modelo proposto conseguiu representar muito bem as variações das concentrações de glicose, biomassa e de pigmento.

Embora não se tenha disponíveis os valores experimentais, observa-se que o modelo previu comportamentos esperados das concentrações da fonte de nitrogênio (peptona: C_{FN}) e de precursor (C_{PR}).

O modelo de produção via conversão de um precursor (PR) em pigmento vermelho (P) mostrou-se pertinente para descrever o bioprocesso, pois a efetiva produção de pigmento, segundo a simulação do modelo inicia-se após mais de 50% da fonte de nitrogênio (FN) ter sido consumida, momento em que o precursor se encontra em sua máxima concentração.

Assim como na modelagem A, na Tabela 5.6 são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos estimados para o modelo B proposto.

Tabela 5.6 - Valores estimados dos parâmetros cinéticos para os cultivos de *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum* visando a produção de pigmento vermelho em biorreator a 20, 24 e 28°C (Modelagem B).

<i>Parâmetros Cinéticos</i>	<i>20°C</i>	<i>24°C</i>	<i>28°C</i>
μ_{\max} (h^{-1})	0,0903 \pm 0,0016	0,117 \pm 0,002	0,202 \pm 0,008
$Y_{X/S}$ (gx/gs)	0,606 \pm 0,007	0,701 \pm 0,008	0,700 \pm 0,011
K_{SX} (gs/gx)	1,19 \pm 0,10	0,965 \pm 0,048	2,66 \pm 0,18
k_m (h^{-1})	0,00531 \pm 0,00024	0,00491 \pm 0,00025	0,00644 \pm 0,00036
k_1 (L/g-h)	0,00354 \pm 0,00428	0,00345 \pm 0,01080	0,00161 \pm 0,02470
k_2 (L/g-h)	0,00368 \pm 2,21	0,00211 \pm 0,00649	0,00112 \pm 1,92
k_3 (L/g-h)	0,00377 \pm 0,00459	0,00401 \pm 0,01280	0,00217 \pm 0,02890
k_4 (L/g-h)	0,00338 \pm 2,03	0,00685 \pm 0,01930	0,00365 \pm 6,26

Obs: os valores dos desvios-padrão foram obtidos considerando intervalo de confiança de 99%.

Conforme apresentado na Tabela 5.6, assim como na modelagem A, os parâmetros μ_{\max} e $Y_{X/S}$ obtidos encontram-se dentro da faixa de valores reportados na literatura para diferentes gêneros fúngicos (BÜHLER et al., 2013; DA COSTA E VENDRUSCOLO, 2017; GOUDAR E STREVETT, 1998; MUSAALBAKRI et al., 2006).

Além disso, verificou-se que os valores de μ_{\max} , $Y_{X/S}$, K_{SX} e k_m foram superiores aos obtidos pela modelagem A nas três temperaturas avaliadas.

Por meio das Figuras 5.32 a 5.34, bem como, da Tabela 5.6, também pode-se observar que para a temperatura de 28°C, ensaio cuja qual obteve-se a menor produção de pigmento, observa-se que o consumo da fonte de nitrogênio (peptona) foi menor frente as fermentações conduzidas a 20 e 24°C. Além disso, o perfil da concentração de precursor no cultivo a 28°C, após atingir sua máxima concentração de 2,0 g/L, permaneceu constante até o final do processo, ou seja, as velocidades de formação e consumo de precursor mantiveram-se na mesma ordem de grandeza.

Com relação aos ensaios de 20 e 24°C, verifica-se que ambos cultivos apresentaram comportamentos similares, nos quais o consumo da fonte de nitrogênio, bem como do precursor, tenderam a ser maiores frente ao cultivo a 28°C, resultando assim em elevadas produções de pigmento vermelho.

Por fim, quanto às constantes cinéticas, observa-se que as constantes k_1 e k_2 , relacionadas com o consumo da fonte de nitrogênio e com a formação de precursor, respectivamente, tenderam a diminuir com o aumento de temperatura, enquanto que as constantes k_3 e k_4 , relacionadas com o consumo de precursor e com a formação de pigmento,

respectivamente, apresentaram seus maiores valores exatamente a 24°C, temperatura na qual se obtiveram os melhores resultados experimentais de produção de pigmento vermelho.

6 CONCLUSÕES

O estudo realizado possibilitou a identificação e o isolamento de uma linhagem endofítica de *Talaromyces minioluteus* / *Penicillium minioluteum*, caracterizada por apresentar uma borda amarelada, um corpo esverdeado e um núcleo verde escuro, assim como, por ser uma potencial fonte produtora de pigmento natural vermelho.

A produção foi avaliada em diferentes meios de cultura, sendo o meio SABORAUD proposto por SUDHA; GUPTA E AGGARWAL (2017) o mais promissor à síntese de biopigmento vermelho.

Mediante os resultados obtidos em cultivos em frascos agitados (50 mL) e em biorreatores de 4 L sob diferentes temperaturas, verificou-se que a mesma apresenta significativa influência na síntese de pigmento vermelho por *Talaromyces minioluteus* / *Penicillium minioluteum*, sendo a temperatura de 24°C a mais favorável para a produção deste bioproduto, verificando-se os melhores resultados de produção tanto em frascos agitados, onde se atingiu uma máxima concentração de pigmento de 10,20 g_p/L e produtividade volumétrica máxima de 0,141 g_p/L.h, quanto em biorreatores, na qual a concentração máxima de pigmento e a produtividade volumétrica máxima alcançaram valores de 8,07 g_p/L e 0,101 g_p/L.h, respectivamente.

Os resultados em termos de consumo de substrato, crescimento celular e produção de pigmento vermelho obtidos nos cultivos em biorreator, de modo geral, foram similares àqueles obtidos em frascos agitados, mostrando que a validação dos resultados em biorreator ocorreu de forma satisfatória.

Com relação à etapa de obtenção das relações entre a absorbância (ABS₅₀₀) e a concentração de pigmento (g_p/L), pode-se afirmar que o procedimento de extração 3 escolhido foi eficaz, permitindo a obtenção de equações para obter a concentração de pigmento (C_{PE}) a partir da absorbância dos caldos tratados.

Por meio das simulações realizadas pôde-se observar que ambas modelagens cinéticas propostas (Modelagens A e B) apresentaram resultados satisfatórios mediante as hipóteses estabelecidas. Entretanto, devido ao melhor ajuste aos dados experimentais coletados, a modelagem cinética B, não convencional, se mostrou a mais adequada para descrever o comportamento do bioprocessamento, mesmo ante sua complexidade metabólica.

Sendo assim, ressalta-se que a avaliação da composição do meio de cultura, o estudo do efeito da temperatura, as elevadas produções, o processo de recuperação de pigmento,

bem como a modelagem cinética do bioprocesso, pontos abordados nesta dissertação, configuram-se como resultados inéditos e de efetiva contribuição ao desenvolvimento do processo da produção de pigmento vermelho pelo fungo endofítico *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos no presente trabalho apresentaram-se promissores e com considerável contribuição ao tema tendo em vista a quantidade extremamente limitada de trabalhos na literatura sobre a produção de pigmento vermelho pela linhagem *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*. Entretanto, outros estudos ainda se fazem necessários, de modo a obter uma melhor compreensão do bioprocesso, bem como uma elevada produção de pigmento vermelho. Com isso, são propostas as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliação do processo fermentativo em batelada alimentada como estratégia de otimização da produção de pigmento vermelho por *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*;
- Estudo da produção de pigmento vermelho em biorreatores de diferentes configurações;
- Avaliação de novas variáveis de processo como pH, agitação, aeração, etc;
- Estudo e desenvolvimento de uma metodologia, via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para quantificação da concentração de pigmento vermelho sintetizado;
- Caracterização do pigmento produzido pela linhagem endofítica *Talaromyces minioluteus*/*Penicillium minioluteum*;
- Estudo e avaliação de potenciais aplicações industriais para o pigmento vermelho produzido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL GHANY, T. M. Safe Food Additives: A Review. **Biological and Chemical Research**, v. 32, n. October, p. 402–437, 2015.
- AFSHARI, M.; SHAHIDI, F.; MORTAZAVI, M. A.; TABATABAI, F.; ES'HAGHI, Z. Investigating the influence of pH, temperature and agitation speed on yellow pigment production by *Penicillium aculeatum* ATCC 10409. **Natural Product Research**, v. 29, n. 14, p. 1300–1306, 2015.
- ALVES, R. W. **Extração de corantes de urucum por processos adsorptivos utilizando argilas comerciais e Colloidal Gas Aphrons**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- ANVISA. **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica-Módulo VII Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**, 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf. Acesso em: 27 out. 2017.
- BARROS, A. A. DE; BARROS, E. B. DE. **A Química dos Alimentos: Produtos Fermentados e Corantes**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química. 88p.-(Coleção Química no cotidiano), 2010.
- BARROWS, J. N.; LIPMAN, A. L.; BAILEY, C. J. Color Additives: FDA ' s Regulatory Process and Historical Perspectives. **Food Safety Magazine**, p. 1–7, 2003.
- BERDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2005.
- BICAS, J. L.; DA SILVA, W. S. **Processo de Produção e Aplicação de Pigmento Oriundo de Fungo *Fusarium oxysporum***, número da patente: BR 1 O 2013 015305-2 A2, Brasil, 2013.
- BLANCH, H. W.; BHAVARAJU, S. M. Non-Newtonian fermentation broths: Rheology and mass transfer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 18, n. 6, p. 745–790, 1976.
- BONDIOLI, F.; MANFREDINI, T.; OLIVEIRA, A. P. N. DE. Pigmentos Inorgânicos: Projeto, Produção e Aplicação Industrial. **Cerâmica Industrial**, v. 3, p. 13–17, 1998.
- BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.
- BÜHLER, R. M. M.; DUTRA, A. C.; VENDRUSCOLO, F.; MORITZ, D. E.; NINOW, J. L. *Monascus* pigment production in bioreactor using a co-product of biodiesel as substrate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 9–13, 2013.

- CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 447–459, 2002.
- CARO, Y.; ANAMALE, L.; FOUILLAUD, M.; LAURENT, P.; PETIT, T.; DUFOSSE, L. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 2, n. 5, p. 174–193, 2012.
- CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 377–399, 2014.
- CARVALHO, J. C. DE; OISHI, B. O.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Biopigments from *Monascus*: Strains selection, citrinin production and color stability. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 885–894, 2005.
- CHATTERJEE, S.; MAITY, S. Characterization of Red Pigment from *Monascus* in Submerged Culture Red Pigment from *Monascus Purpureus*. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 5, n. 12, p. 2102–2108, 2009.
- CHINTAPENTA, L. K.; RATH, C. C.; MARINGINTI, B.; OZBAY, G. Culture conditions for growth and pigment production of a Mangrove *Penicillium* species. **Journal of Multidisciplinary Scientific Research**, v. 2, n. 3, p. 1–5, 2014.
- CHO, Y. J.; HWANG, H. J.; KIM, S. W.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 13–23, 2002a.
- CHO, Y. J.; PARK, J. P.; HWANG, H. J.; KIM, S. W.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, 2002b.
- CHRISTIE, R. M. **Colour Chemistry**. Royal Society of Chemistry, 2001.
- CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203–220, 2002.
- COSTA, C. L. L. **Estratégias para melhoria da produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. 2014. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- COSTA, C. L. L.; BADINO, A. C. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures without and with glycerol pulses under different temperature conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 1–7, dez. 2012.

- DA COSTA, J. P. V.; VENDRUSCOLO, F. Production of red pigments by *Monascus ruber* CCT 3802 using lactose as a substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 50–55, jul. 2017.
- DEMAIN, L. Regulation of secondary metabolism in fungi. **Pure & Appl Chem.**, v. 58, n. 2, p. 219–226, 1986.
- DIAS, M. I.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food & function**, v. 6, n. 4, p. 1035–1052, 2015.
- DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International journal of food science & technology**, v. 35, n. 1, p. 5–22, 2000.
- DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S. A.; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56–61, 2014.
- DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 313–321, 2006.
- DUFOSSÉ, L. **Pigments, Microbial**, 2009. 457-471.
- DUVAL, J.; PECHER, V.; POUJOL, M.; LESELLIER, E. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 812–833, 2016.
- FARRELL, J.; ROSE, A. Temperature effects on microorganisms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 101–120, 1967.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. Dossiê corantes. **Revista-FI - FOOD INGREDIENTS BRASIL**, n. 9, p. 40–59, 2009.
- FOUILLAUD, M.; VENKATACHALAM, M.; GIRARD-VALENCIENNES, E.; CARO, Y.; DUFOSSÉ, L. Anthraquinones and derivatives from marine-derived fungi: Structural diversity and selected biological activities. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, p. 1–64, 2016.
- FRISVAD, J. C. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. January, p. 1–7, 2015.
- FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 231–240, 2008.
- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, n. 1, p. 1–174, 2004.
- FURUKAWA, K.; OHSUYE, K. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal α -amidating enzyme. **Cytotechnology**, v. 26, n. 2, p. 153–164, 1998.

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

GEWEELY, N. S. Investigation of the optimum condition and antimicrobial activities of pigments from four potent pigment-producing fungal species. **Journal of Life Sciences**, v. 5, n. 9, 2011.

GOMES, L. M. M. (2012). **Inclusão de Carotenoides de Pimentão Vermelho em Ciclodextrinas e Avaliação da Sua Estabilidade, Visando Aplicação Em Alimentos**. 2012. Dissertação (Mestre em Ciências Aplicadas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

GONZÁLEZ, N. D. L. **Secagem convectiva de papel reciclado com incorporação de corantes naturais**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

GOUDAR, C. T.; STREVETT, K. Estimating growth kinetics of *Penicillium chrysogenum* by nonlinear regression. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, n. 3, p. 191–199, 1998.

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

GÜRSES, A.; AÇIKYILDIZ, M.; GÜNES, K., GÜRSES, M. S. Dyes and Pigments: Their Structure and Properties. In: **Dyes and Pigments**. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer International Publishing, 2016. p. 13–29.

HAJJAJ, H.; BLANC, P.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J.; 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**, v. 27, n. 8, p. 619–625, 2000.

HAJJAJ, H.; FRANÇOIS, J. M.; GOMA, G.; BLANC P. J. Effect of Amino Acids on Red Pigments and Citrinin Production in *Monascus ruber*. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 3, p. 156–159, 2012.

HAKAIM, O. A.; ARAFA, A. A.; ABDOU, L. A. W. Current Status and Future Outlook Pertaining to Encapsulation of Organic Pigments: Review Article. **World Journal of Textile Engineering and Technology**, v. 1, p. 1–22, 2015.

HERBEST, W.; HUNGER, K. **Industrial Organic Pigments**. 3 ed. Alemanha Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004. v. 3

HILL, D. J. Is there a future for natural dyes? **Review of Progress in Coloration and Related Topics**, v. 27, n. 1, p. 18–25, 1997.

HUANG, Q. et al. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 5, p. 609–630, 2007.

JOSHI, V. K.; ATTRI, D.; BALA, A.; BHUSHAN, S. Microbial Pigments. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. July, p. 362–369, 2003.

KHODAEI, A.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A.; HOUBRAKEN, J. Five new species of *Penicillium* and *Talaromyces* for mycobiota of Iran. **Rostaniha**, v. 16, n. 2, p. 186–199, 2015.

KIM, H. J.; KIM, J. H.; OH, H. J.; SHIN, C. S. Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 649–655, 2002.

KRAIRAK, S.; YAMAMURA, K., IRIE, R.; NAKAJIMA, M.; SHIMIZU, H.; CHIM-ANAGE, P.; YONGSMITH, B.; SHIOYA, S. Maximizing yellow pigment production in fed-batch culture of *Monascus sp.* **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 4, p. 363–367, 2000.

KUMAR, A.; VISHWAKARMA, H. S.; SINGH, J.; DWIVEDI, S.; KUMAR, M. Microbial Pigments: Production and Their Applications in Various Industries. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 203–212, 2015.

LARSSON, A. M.; ANDERSSON, R.; STAHLBERG, J.; KENNE, L.; JONES, T. A. Dextranase from *Penicillium minioluteum*: Reaction course, crystal structure, and product complex. **Structure**, v. 11, n. 9, p. 1111–1121, 2003.

LEE, S. D. *Kineococcus rhizosphaerae sp. nov.*, isolated from rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2204–2207, 2009.

LOPES, T. J.; XAVIER, M.; QUADRI, M. G.; QUADRI, M. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Current Agricultural Science and Technology**. 2007.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARTINI, C. Purification of edopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 219–224, 1987.

MAPARI, S. A.; MEYER, A. S.; THRANE U.; FRISVAD, J. C. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2009.

MAPARI, S. A.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 231–238, 2005.

MARTIN, J. F.; DEMAIN, A. L. Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiological reviews**, v. 44, n. 2, p. 230–251, 1980.

MEINICKE, R. M. **Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MEINICKE, R. M.; VENDRUSCOLO, F.; MORITZ, D. E.; OLIVEIRA, D.; SCHMIDELL, W.; SAMOHYL, R. W.; NINOW, J. L. Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 238–242, 2012.

MÉNDEZ-ZAVALA, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; LARA-VICTORIANO, F.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Fungal production of the red pigment using a xerophilic strain *Penicillium purpurogenum* GH-2. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 6, n. 3, p. 267–273, 2007.

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

MENDONÇA, J. N. **Identificação e Isolamento de Corantes Naturais produzidos por Actinobactérias**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MIYAKE, T.; KONO, I.; NOZAKI, N.; SAMMOTO, H. Analysis of Pigment Compositions in Various *Monascus* Cultures. **Food Science and Technology Research**, v. 14, n. 2, p. 194–197, 2008.

MORITZ, D. E. **Produção do Pigmento *Monascus* por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MUSAALBAKRI, A. M.; ARIFF, A.; ROSFARIZAN, M.; ISMAIL, A. K. M. Kinetics and modeling of red pigment fermentation by *Monascus purpureus* FTC 5391 in 2-litre stirred tank fermenter using glucose as a carbon source. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 33, n. 2, p. 277–284, 2006.

NICOLETTI, ROSARIO TRINCONE, A. Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. **Marine Drugs**, p.37, 2016.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n. 1–2, p. 111–136, 2003.

NIIZU, P. Y. **Fontes de carotenóides para a saúde humana**. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

NIMNOI, P.; LUMYONG, S. Improving Solid-State Fermentation of *Monascus purpureus* on Agricultural Products for Pigment Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1384–1390, 2011.

OGBONNA, C. N. Production of food colourants by filamentous fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 26, p. 960–971, 14 jul. 2016.

OLIVEIRA, F.; BARBIERI, G. S.; EBINUMA, V. C. S. Effect of nitrogen source on *Talaromyces amestolkiae* colorants. **XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA**. Anais...2017.

OROZCO, S. F. B.; KILIKIAN, B. V. Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 263–268, 2008.

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. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 333–341, 1995.

PEBERDY, J. F. **Penicillium and Acremonium**. Springer Science & Business Media, LLC, 1987.

PEREIRA, D. G.; KILIKIAN, B. V. Effect of yeast extract on growth kinetics of *Monascus purpureus*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 91–93, n. 5, p. 311–6, 2001.

PEREIRA, M. L.; BADINO, A. C.; NETO, A. B. Extração e purificação de pigmento produzido pelo fungo *Talaromyces* complexo *minioluteus*. **XII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA**. Anais...2017.

PITT, J. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **London: Academic Press**, 1979.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 14, n. 2, p. 237–250, 2003.

RAO, M. P. N.; XIAO, M.; LI, W.-J. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 22 jun. 2017.

REYNDERS, M. B.; RAWLINGS, D. E.; HARRISON, S. T. L. Studies on the growth, modelling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. **Biotechnology letters**, v. 18, n. 6, p. 649–654, 1996.

ROMANO, L. H. **Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos Isolados de *Tabebuia spp.* e *Hymenaea courbaril* e Identificação da Produção de Metabólitos de Interesse Biotecnológico**. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

SÁ, R. A. DE. **Estudo da Produção de Metabólitos Secundários por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2007.

SANTOS-EBINUMA, V. C. **Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275**. Tese (Doutorado em Ciência Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. **Revista Fitos**, p. 1–24, 2007.

SCOTTER, M. J. **Colour Additives for Foods and Beverages**. Elsevier, 2015.

SHULER, M. L.; KARGI, F.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1992.

SOUZA, R. M. DE. **Corantes naturais alimentícios e seus benefícios à saúde**. 2012. Monografia de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Escola de Farmácia, Centro Universitário da Zona Oeste, Rio de Janeiro.

SUDHA; GUPTA, C.; AGGARWAL, S. Optimization and extraction of extra and intracellular color from *Penicillium minioluteum* for application on protein fibers. **Fibers and Polymers**, v. 18, n. 4, p. 741–748, 2017.

TANG, H.-Y.; ZHANG, Q.; GAO, Y. Q.; ZHANG, A.-L.; GAO, J. M. Miniolins A–C, novel isomeric furanones induced by epigenetic manipulation of *Penicillium minioluteum*. **RSC Advances**, v. 5, n. 3, p. 2185–2190, 2015.

TEIXEIRA, M. F.; MARTINS, M. S.; DA SILVA, J. C.; KIRSCH, L. S.; FERNANDES, O. C. C.; CARNEIRO, A. L. B.; DE CONTI, R.; DURÁN, N. Amazonian Biodiversity: Pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-Characterizations, Antibacterial Activities and their Toxicities. **Current Trends in Biotechnology & Pharmacy**, v. 6, n. 3, 2012.

VAN TIEGHEM, M. P. *Monascus*, genre nouveau de l'ordre des Ascomycetes. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v. 31, n. 5, p. 226–231, 1884.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S.-B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 2000, p. 343–371, 2014.

WROLSTAD, R. E.; CULVER, C. A. Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 59–77, 2012.

XU, J.; NAKAZAWA, T.; UKAI, K.; KOBAYASHI, H.; MANGINDAAN, R. E. P.; WEWENGKANG, D. S.; ROTINSULU, H.; NAMIKOSHI, M. Tetrahydrobostrycin and 1-deoxytetrahydrobostrycin, two new hexahydroanthrone derivatives, from a marine-derived fungus *Aspergillus sp.* **Journal of Antibiotics**, v. 61, n. 7, p. 415–419, 2008.

ZAIN, M. E.; RAZAK, A. A.; EL-SHEIKH, H. H.; SOLIMAN, H. G.; KHALIL, A. M. Influence of growth medium on diagnostic characters of *Aspergillus* and *Penicillium* species. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 5, p. 280–286, 2009.