



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**

*Campus* **DE VITÓRIA DA CONQUISTA**

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E**

**BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM**



**GLEIZA MOREIRA COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PIGMENTOS DE FUNGOS**

**VITÓRIA DA CONQUISTA - BA**

**AGOSTO- 2018**

**GLEIZA MOREIRA COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PIGMENTOS DE FUNGOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora:** Maria Patrícia Milagres

**Co-Orientadora:** Helena Bonciani Nader

**VITÓRIA DA CONQUISTA - BA**

**AGOSTO - 2018**

**TERMO DE APROVAÇÃO****GLEIZA MOREIRA COSTA****CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE PIGMENTOS DE FUNGOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular)

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018

**Comissão Examinadora:**

---

Profa. Dra. Janaína Freitas  
(UESB)

---

Prof. Dr. Lucas Mirada Marques  
(UFBA)

---

Profa. Dra. Janaína Silva Freitas

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

A minha família por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas, por me ensinarem a ser forte e nunca desistir dos meus sonhos.

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Patrícia Milagres e a minha co-orientadora Helena Nader, obrigada pela confiança.

Agradeço também a colaboração do Prof. Dr. Gildomar Valasques Júnior e do Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz.

Aos colegas Tátilla, Romário, Camilla e Aline obrigada pela disponibilidade demonstrada e apoio de sempre.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) por todo suporte acadêmico e pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo produzir pigmentos biotecnológicos e avaliar a estabilidade e algumas atividades biológicas *in vitro* a partir da levedura *Pseudozyma CCMB 300* e do fungo filamentosso *Penicillium roqueforti* ATCC 10110. O cultivo dos fungos foi feito em estado sólido e submerso. A extração dos pigmentos foi realizada aplicando o planejamento simplex-centroide. A espectrofotometria de absorção no Ultravioleta-visível (UV-vis), a Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR), Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas, com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) em modos positivo e negativo (CLAE-EM/EM) foram as técnicas utilizadas para análise do perfil químico das amostras. A estabilidade dos pigmentos foi avaliada em diferentes valores de pH (2-10) e temperaturas (10-100 °C) e frente a luz solar (2 horas). A atividade antioxidante foi realizada pelo método do sequestro do radical estável ( $\bullet$ DPPH), captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup> e pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. A atividade antibacteriana foi realizada frente as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) pelo método da microdiluição em caldo. De modo geral, a *Pseudozyma 300* produziu apenas pigmentos intracelulares (cor amarela), sendo a acetona o melhor solvente extrator. Já o *P. roqueforti*, produziu somente pigmentos extracelulares (cor verde), sendo o etanol o solvente mais viável para extração. A análise de varredura com UV-vis revelou um pico intenso na região de 450 nm para o pigmento da *Pseudozyma 300* e picos na região de 500 para o pigmento do *P. roqueforti*. O espectro FT-IR da fração do pigmento da *Pseudozyma 300* exibiu estiramentos em 2923, 2853, 1463. Já a fração de acetona do pigmento do *P. roqueforti* (FAPP300) exibiu estiramentos em 3277, 2924, 1830, 1076 e 1020 nm. A FEPPR inibiu mais o radical  $\bullet$ DPPH (IC 42,22  $\pm$ 0,1  $\mu$ g/mL) e apresentou compostos fenólicos (80,25 $\pm$ 0,1  $\mu$ g EAG/mg). A FAPP300 inibiu melhor o radical ABTS<sup>•+</sup> (IC 36,58 $\pm$ 0,1  $\mu$ g/mL) e apresentou 52% de inibição do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Apenas a FEPPR apresentou Concentração inibitória mínima (CIM) de aproximadamente 50  $\mu$ g/mL e concentração bactericida mínima (CBM) de 1000  $\mu$ g/mL frente a cepa *S. aureus*. Ambos pigmentos foram termoestáveis em todas temperaturas testadas e frente a luz solar. Além disso, a FEPPR apresentou estabilidade em pH neutro e básico. Os resultados deste trabalho sugerem que a *Pseudozyma 300* e o *P. roqueforti*, podem ser uma fonte em potencial de pigmentos naturais com algumas atividades biológicas.

**Palavras-chaves:** solventes extratores, atividade antioxidante, atividade antibacteriana, estabilidade físico-química.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
REFERÊNCIAS .....	4
CAPITULO I - REFERENCIAL TEÓRICO .....	6
1 PIGMENTOS NATURAIS E CORANTES SINTÉTICOS.....	6
2 <i>PENICILLIUM ROQUEFORT</i> .....	8
3 <i>PSEUDOZYMA 300</i> .....	8
4 MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS.....	9
5 ESTUDO DOS PIGMENTOS FÚNGICOS .....	11
REFERÊNCIAS .....	17
CAPÍTULO II - ARTIGO .....	22
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS .....	57
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	62

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Gráficos das Superfícies de respostas das extrações dos pigmentos em função das variáveis independentes etanol, acetona e DMSO.....	33
<b>Figura 2. 2A.</b> Gráfico de Pareto mostrando a influência dos solventes Acetona, Etanol e DMSO na extração do pigmento da <i>Pseudozyma 300</i> . <b>2B.</b> Gráfico de Pareto mostrando a influência dos solventes Acetona, Etanol e DMSO na extração do pigmento do <i>P. roqueforti</i> .....	35
<b>Figura 3.</b> Espectro do pigmento da <i>Pseudozyma 300</i> no infravermelho com transformada em Furrier.....	37
<b>Figura 4.</b> Espectro do pigmento do <i>P. roqueforti</i> no infravermelho com transformada em Furrier.....	38
<b>Figura 5.</b> Cromatograma obtido após análise do pigmento FAPP300 produzido pela <i>Pseudozyma 300</i> .....	38
<b>Figura 6.</b> Detecção de alcaloides pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD).....	41

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I- REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Tabela 1:</b> Estudo dos pigmentos fúngicos.....	13
---	----

### CAPÍTULO II – ARTIGO

<b>Tabela 1.</b> Matriz de design do planejamento centroid-simplex aplicado para extração dos pigmentos intracelulares e extracelulares da <i>Pseudozyma</i> e do <i>P. roqueforti</i> .....	32
<b>Tabela 2. 2A.</b> ANOVA para análise de variância e regressão para o modelo de extração do pigmento da <i>Pseudozyma</i> 300. <b>2B.</b> ANOVA para análise de variância e regressão para o modelo de extração do pigmento do <i>P. roqueforti</i> .....	34
<b>Tabela 3.</b> Matriz experimental da produção de pigmentos intracelulares da <i>Pseudozyma</i> 300.....	35
<b>Tabela 4.</b> Estabilidade dos pigmentos das frações dos pigmentos da <i>Pseudozyma</i> 300 e do <i>P. roqueforti</i> .....	35
<b>Tabela 5.</b> Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das frações dos pigmentos da <i>Pseudozyma</i> 300 e do <i>P. roqueforti</i> .....	41
<b>Tabela 6.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (MBC) das frações dos pigmentos da <i>Pseudozyma</i> 300 e do <i>P. roqueforti</i> .....	42

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES**

PDA - Ágar Batata Dextrose

•DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ABTS<sup>•+</sup> - (2,2 AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid)

Trolox - (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

IC50 - Concentração do composto que induz metade do efeito máximo (50% de inibição)

FEPR- Fração Etanólica do *P. roqueforti*

FAP300 - Fração acetona da *Pseudozyma 300*

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência

UHPLC- Cromatografia líquida de ultra eficiência

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

MS - Espectrometria de massas

G - Gravidade

CIM- Concentração inibitória mínima

CBM - Concentração bactericida mínima



## 1. INTRODUÇÃO

Os corantes e pigmentos são aditivos amplamente empregados em muitas indústrias, visto que a cor cumpre um papel essencial ao fornecer uma aparência atraente aos produtos (PARMAR et al., 2018). Pigmentos naturais vêm sendo considerados uma opção mais segura para saúde humana, já que estudos atuais sugerem possíveis efeitos tóxicos causados pelos corantes sintéticos, incluindo potencial genotóxico (ATLI ŞEKEROĞLU et al., 2017), nefrotóxico (ERDEML et al., 2017) e hepatotóxico (EL-DESOKYET et al., 2017). Além disto, tendo em vista que muitos precursores dos corantes sintéticos geralmente são derivados de produtos petroquímicos, este fato aumenta ainda mais a preocupação de consumidores quanto à segurança da ingestão por tempo prolongado dessas substâncias, além de que esta é uma fonte de corante não renovável (KOBYLEWSKI et al., 2012).

Neste contexto, antagonicamente aos corantes sintéticos, além de colorir, geralmente muitos pigmentos naturais possuem propriedades benéficas à saúde humana, incluindo atividade antioxidante (JIMÉNEZ et al., 2018), anticancerígena (SOUMYA et al., 2018), anti-inflamatória (PANGESTUTI et al., 2017) e antibacteriana (KIM et al., 2018). Ainda que frequentemente os microrganismos sejam associados à contaminação e degradação de alimentos, os mesmos possuem grandes vantagens de produção de pigmentos naturais em condições laboratoriais quando comparado às outras fontes, como plantas e insetos, podendo-se citar a independência sazonal, processamento mais fácil e altos rendimentos do composto (DA COSTA et al., 2016).

Entre os microrganismos produtores de pigmentos naturais destacam-se os fungos filamentosos e as leveduras (DUFOSSÉ et al., 2014). O fungo filamentoso *Penicillium oxalicum* produz um pigmento vermelho (*arpink red*), sendo este já vendido comercialmente (DUFOSSÉ et al., 2014), as leveduras *Rhodotorula toruloides* (PARK et al., 2017), *Xanthophyllomyces dendrorhous* (BARREDO et al. 2017) e *Phaffia rhodozyma* (SCHEWE et al 2017) são potenciais fontes de pigmentos carotenoides, dentre outros.

O *Penicillium roqueforti* é característico da região da França e comumente utilizado para produção de queijos-azuis como o Roquefort e Gorgonzola. Este fungo filamento já foi amplamente estudado para produção de enzimas, incluindo as lipídicas e celulolíticas (FERRAZ, et al., 2018; LI et al., 2010). A *Pseudozyma* 300 é uma levedura peculiar da região do semiárido nordestino. Os poucos trabalhos encontrados desta levedura estão

relacionados com a produção de polissacarídeos e enzimas líticas (ASSIS et al., 2014; SENA et al., 2012). Apesar da importância biotecnológica já apresentada na literatura pela *Pseudozyma* 300 e *P. Roqueforti* são escassos trabalhos que reportam a utilização destas cepas para produção de pigmentos naturais.

Portanto, diante das vantagens do uso de pigmentos naturais citadas acima, este trabalho teve como objetivo extrair, caracterizar parcialmente, avaliar a estabilidade e algumas atividades biológicas *in vitro* de pigmentos naturais obtidos da levedura *Pseudozyma* CCMB 300 e do fungo filamentosso *Penicillium roqueforti* ATCC 10110.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Produzir pigmentos biotecnológicos a partir da levedura *Pseudozyma CCBM 300* e do fungo filamentosso *Penicillium roqueforti* ATCC 10110.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e fracionar por partição líquido-líquido o pigmento intracelular e extracelular da *Pseudozyma CCBM 300* e do *P. roqueforti* ATCC 10110 sob cultivo em estado sólido e submerso.
- Caracterizar parcialmente os pigmentos obtidos da *Pseudozyma CCBM 300* e do *P. roqueforti* ATCC 10110 por UV-vis, IF-TR e CLAE-EM/EM.
- Testar a termoestabilidade, fotossensibilidade e estabilidade sob diferentes pHs dos pigmentos obtidos da *Pseudozyma CCBM 300* e dos *P. roqueforti* ATCC 10110.
- Avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro* dos pigmentos extraídos da *Pseudozyma CCBM 300* e do *P. roqueforti* ATCC 10110 pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH•, sequestro do radical livre ABTS•<sup>+</sup> e pelo sistema da inibição da co-oxidação do β-caroteno.
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos pigmentos extraídos da *Pseudozyma CCBM 300* e do *P. roqueforti* ATCC 10110.
- Avaliar o potencial antiproliferativo *in vitro* dos pigmentos sobre células tumorais MCF-7 (carcinoma de mama humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano).

## REFERÊNCIAS

ASSIS, Sandra A. et al. Production, Characterization and Application of Inulinase from *Pseudozyma* sp. CCMB 300. **Journal of Advances in Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 382-392, 2014.

ATLI ŞEKEROĞLU, Zülal et al. Effects of tartrazine on proliferation and genetic damage in human lymphocytes. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 27, n. 5, p. 370-375, 2017.

BARREDO, Jose L. et al. Biosynthesis of astaxanthin as a main carotenoid in the heterobasidiomycetous yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 3, p. 44, 2017.

DA COSTA, Jaqueline Pires Vital; VENDRUSCOLO, Franciolo. Production of red pigments by *Monascus ruber* CCT 3802 using lactose as a substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 50-55, 2017.

DUFOSSE, Laurent et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current opinion in biotechnology**, v. 26, p. 56-61, 2014.

EL-DESOKY, G. E. et al. Curcumin protects against tartrazine-mediated oxidative stress and hepatotoxicity in male rats. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, p. 635-645, 2017.

ERDEMLI, Mehmet Erman et al. The protective role of crocin in tartrazine induced nephrotoxicity in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 930-935, 2017.

FERRAZ, José Lucas de Almeida Antunes et al. Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. **Bioresource technology**, v. 248, p. 214-220, 2018.

JIMÉNEZ, Maria Elisa Pailliè et al. Extraction and partial characterisation of antioxidant pigment produced by *Chryseobacterium* sp. kr6. **Natural product research**, p. 1-9, 2018.

KIM, Daehwan; KU, Seockmo. Beneficial Effects of *Monascus* sp. KCCM 10093 Pigments and Derivatives: A Mini Review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 98, 2018.

KOBYLEWSKI, Sarah; JACOBSON, Michael F. Toxicology of food dyes. **International journal of occupational and environmental health**, v. 18, n. 3, p. 220-246, 2012.

LI, Ning; ZONG, Min-Hua. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 43-54, 2010.

PARK, Young-Kyoung; NICAUD, Jean-Marc; LEDESMA-AMARO, Rodrigo. The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications. **Trends in biotechnology**, 2017.

PANGESTUTI, Ratih; KIM, Se-Kwon. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of functional foods**, v. 3, n. 4, p. 255-266, 2011.

PARMAR, Ramendra Singh; SINGH, Charu. A comprehensive study of eco-friendly natural pigment and its applications. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 13, p. 22-26, 2018.

SCHEWE, Hendrik et al. High concentrations of biotechnologically produced astaxanthin by lowering pH in a *Phaffia rhodozyma* bioprocess. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 3, p. 319-326, 2017.

SENA, Amanda Reges de et al. Application of Doehlert experimental design in the optimization of experimental variables for the *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) and *Pseudozyma* sp. (CCMB 300) cell lysis. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 761-767, 2012.

SOUMYA, K. et al. Characterization of a red pigment from *Fusarium chlamydosporum* exhibiting selective cytotoxicity against human breast cancer MCF-7 cell lines. **Journal of applied microbiology**, 2018.

## CAPITULO I - REFERENCIAL TEÓRICO

### 1 PIGMENTOS NATURAIS E CORANTES SINTÉTICOS

Corantes são substâncias largamente utilizadas pelas indústrias alimentícia, têxtil, cosmética e farmacêutica, visto que a cor está diretamente ligada à aceitação sensorial de um produto (CARDOSO et al., 2017). O primeiro corante sintético foi produzido pelo químico inglês William Henri Perkin em 1856, denominado de mauveína (3-amino-2-metil-5-fenil-7-(p-tolilamino)-5-fenazínio). Os corantes sintéticos adentraram o mercado mundial devido à sua facilidade de produção, baixo custo, ausência de sabor e alto poder colorante (PRADO et al., 2009).

A diferença entre pigmentos e corantes se dá basicamente pelo tamanho da partícula e o grau de solubilidade no meio em que estão inseridos. Assim, pigmentos possuem tamanho entre 1-2  $\mu\text{m}$  sendo praticamente insolúvel quando incorporados na água, já o segundo é menor e solúvel (TORRES et. 2016).

Os pigmentos naturais são considerados uma opção mais segura tanto para a saúde quanto para o meio ambiente, já que os corantes sintéticos vêm sendo associados a efeitos prejudiciais à saúde, como os corantes amaranço e eritrosina que indicaram efeitos citostáticos e citotóxicos *in vitro* (MPOUNTOUKAS et al., 2010). Estudos com a tartrazina sugerem efeitos de nefrotoxicidade *in vivo* (ERDEMLI et al., 2017), citotoxicidade *in vitro* (MPOUNTOUKAS et al., 2010), interferência na aprendizagem e na memória *in vivo* (GAO et al., 2011) e alterações em parâmetros fisiológicos e bioquímicos *in vivo* (AREFIN et al., 2017). Além disso, a maioria dos corantes sintéticos são provenientes de subprodutos do petróleo, sendo esta uma fonte não-renovável (KOBYLEWSKI JACOBSON, 2012). Nesta perspectiva, a crescente demanda por produtos naturais que realmente sejam benéficos à saúde humana ocasionou o aumento significativo de pesquisas voltadas à área destes compostos naturais.

Os pigmentos naturais são derivados de fontes como insetos, plantas ou microrganismos (bactérias, algas e fungos) (BÜHLER et al., 2015). Além da função colorante, geralmente, estes compostos possuem metabólitos ativos com atividades biológicas, podendo-se citar estudos como o de ARAÚJO et al. (2018) no qual os resultados do seu estudo sugerem um efeito protetor do pigmento carotenoide bixina contra a colite induzida pelo ácido trinitrobenzenossulfônico em ratos. Os extratos de *Curcuma*

*longa* indicaram capacidade de redução dos efeitos hepatotóxicos causados pelo mercúrio em ratos (JOSHI et al., 2017), os pigmentos carotenoides da *Rhodotorula glutinis* apresentaram atividade bacteriana frente as cepas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* (YOLMEH et al., 2016).

Sabe-se que as principais fontes de pigmentos naturais são as plantas e os microrganismos. Neste contexto, embora as plantas sejam adequadas para produção de pigmentos, tais compostos responsáveis pela cor podem não estar disponíveis o ano todo, uma vez que, na maioria das vezes, dependem de fatores sazonais e geográficos (TULI et al., 2015; GMOSEK et al., 2017). Os pigmentos microbianos destacam-se como uma fonte alternativa prontamente disponível na natureza. Além do mais, possui versatilidade no uso de substratos para seu crescimento e permite melhor controle das condições operacionais, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e intensidade luminosa (CARDOSO et al., 2017; RAO et al. 2017).

A produção de biomoléculas por microrganismo possui ligação direta com condições de bioprocessos (SHARMILA et al., 2013). Desse modo encontrar a melhor maneira de conduzir o processo e definir as concentrações de nutrientes é muito importante, não só com o intuito de redução do custo de produção, como também aumentar a produção de pigmentos (TULI et al., 2015; TORRES et al., 2016). Entre os microrganismos produtores de pigmentos destacam-se os fungos filamentosos e as leveduras (DUFOSSÉ et al., 2014; DUFOSSÉ et al., 2005).

O fungo filamentoso *Monascus ssp.* produz pigmentos amarelos (ankaflavine, monascine), laranjas (rubropunctatine, monascorubrine) e vermelhos (rubropunctamine, monascorubramine) (RAO et al. 2017). O fungo *Talaromyces albobiverticillius* produz pigmentos vermelhos similares aos do *Monascus* (VENKATACHALAM et al., 2018), a levedura *Phaffia rhodozyma* produz pigmento *astaxantina* (SCHEWE et al., 2017), a *Rhodotorula glutinis* sintetiza o betacaroteno (MURUGESAN et al., 2017). Segundo DUFOSSÉ et al., 2014 as indústrias alimentícias já utilizam alguns pigmentos obtidos por fermentação fúngica, incluindo o pigmento *Monascus*, o *Arpink Red* do *Penicillium oxalicum*, a riboflavina da *Ashbya gossypii* e o licopeno e  $\beta$ -caroteno da *Blakeslea trispora* (DUFOSSÉ, 2014). O ang-kak (arroz vermelho) sintetizado pelo *Monascus púpureos* é o pigmento de origem fúngico comercializado mais antigo (DUFOSSÉ et al., 2005).

## **2 *PENICILLIUM ROQUEFORT***

O gênero *Penicillium* pertence à família Trichocomaceae (HOUBRAKEN et al., 2011). Trata-se de um ascomiceto anamórfico, que compreende mais de 300 espécies (VISAGIE et al., 2014). Normalmente, possui micélios septados e sua reprodução é do tipo assexuada por esporulação (GHANBARI et al., 2014). Algumas espécies de *Penicillium* produzem metabólitos de interesse biotecnológico, como o fungo *P. oxalicum* produtor de celulase extracelular,  $\beta$ -xilosidase e pigmento (LI et al., 2016), o *P. chrysogenum* fonte da penicilina (PIRT et al., 1967), o *P. purpurogenum* sintetiza pigmento vermelho (MENDEZ et al., 2011), dentre outros. Na indústria de laticínios o *P. roqueforti* destaca-se sendo indispensável para produção de queijos azuis, incluindo o Roquefort e Gorgonzola (GHANBARI et al., 2014)

O queijo tipo Roquefort é fabricado com o fungo filamentososo *P. roqueforti*, o qual confere à massa uma cor verde-azulada. Este fungo filamentososo possui rápida colonização o que, geralmente, evita o crescimento de outros microrganismos (LE DRÉAN et al., 2010). Durante o processo de maturação do queijo, o *P. roqueforti* produz enzima lipase que induz a formação de ácidos caproicos, os quais são responsáveis pelo sabor e aroma característicos desse queijo (KINSELLA et al., 1976). A fabricação de forma tradicional desse queijo é feita nas cavernas de Cobalou, no Sul da França, mais precisamente na cidade de Roquefort-sur-Soulzon, sendo por este motivo o nome da iguaria.

O *P. roqueforti* está presente na lista disponibilizada pela Food and Drug Administration (FDA) de fungos que Geralmente Reconhecidos Como Seguros (GRAS). Além da produção de queijos esta cepa é fonte de outros compostos biotecnológicos, como enzima celulolítica utilizada no processo de sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos (FERRAZ et al., 2017). Segundo KALAI et al. (2017) o *P. roqueforti* cresce bem em condições laboratoriais com temperaturas entre 0-33,5 °C (ótima em 26,9 °C), pH de 2,9 e 5,6, respectivamente.

## **3 *PSEUDOZYMA 300***

A *Pseudozyma 300* trata-se de uma levedura endofítica. Fungos endofíticos são agentes que residem nos tecidos da planta e geralmente proporciona diversos benefícios as mesmas, como ajuda no desenvolvimento, aumento da resistência em relação aos fito-

patógenos, elimina ervas daninhas e aumenta a tolerância aos estresses abióticos e bióticos (ALURAPPA et al., 2018).

Tais fungos podem ser considerados um reservatório de compostos bioativos (biocompostos) ainda pouco explorados, como os metabólitos beauvericina, para-hidroxibenzaldeído, ácido indol-3-carboxílico e quinizarina) isolados do fungo endofítico *Epicoccum nigrum* que indicam potencial antioxidante e antibacteriano (DZOYEM et al. 2017) e o extrato bruto obtido do fungo endofítico que indicou atividade antibacteriana frente a bactéria *S. aureus* (ELAASSER et al., 2018), dentre outros.

Segundo SENA et al. (2014) a *Pseudozyma 300* é fonte de enzimas líticas, as quais podem ser empregadas para a obtenção de vários produtos biotecnológicos, incluindo pigmentos naturais. Outros estudos com essa levedura mostram que a mesma é uma fonte promissora de exopolissacarídeos, com significativa atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos (SANTIAGO et al., 2011).

#### **4 MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS**

A extração dos pigmentos microbianos, intracelulares e/ou extracelulares, comumente é realizada com solventes orgânicos, seguindo por outras técnicas mecânicas de modo a obter o máximo rendimento do composto. Dentre os solventes mais utilizados destacam-se: acetona, DMSO, acetato de etila, éter de petróleo, metanol e etanol, podendo estes encontrar-se concentrados, diluídos ou misturados (JIMÉNEZ et al., 2017).

O processo para ruptura total das células microbianas e obtenção do pigmento intracelular pode ser realizado a partir de procedimentos como: banho ultrassônico; centrifugação; maceração; trituração com perolas de vidro; uso de solventes; entre outros (VENIL et al., 2016; ZAGHDOUDI et al., 2015).

SOUZA et al. (2016) em seus experimentos para obtenção de pigmentos fúngicos, primeiro avaliou os extratos através da Cromatografia em camada fina (TLC). Em seguida as amostras polares foram direcionadas para fracionamento por cromatografia numa coluna Sephadex usando metanol como eluente. Já os extratos apolares foram fracionados por cromatografia em coluna de fase estacionária de sílica-gel, utilizando como eluentes misturas de hexano:acetato de etila e acetato de etila:metanol com ordem de polaridade crescente.

Após processo de extração e separação dos pigmentos é importante realizar sua caracterização química de modo a obter a estrutura molecular do composto. Para este fim, são realizadas análises, como Ultravioleta-visível, Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e Espectroscopia de massas (MS). Tais técnicas analíticas são amplamente utilizadas para a identificação, confirmação e estudo das estruturas químicas de diversos pigmentos (JEHLICKA et al., 2013).

A técnica de FT-IR tem por objetivo identificar os grupos funcionais presentes na molécula. A região que apresenta número de ondas entre  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  é a mais importante do ponto de vista de caracterização de compostos orgânicos, denominada de infravermelho médio. Essa é uma técnica rápida e pode fornecer dados valiosos para a caracterização do pigmento, gerando bandas características que indicam a possível classe do composto (DE ALMEIDA BARBOSA et al., 2007).

A CLAE utiliza uma fase móvel que corresponde ao solvente empregado e uma fase estacionária que corresponde a partículas porosas esféricas ou irregulares que apresentam diferentes diâmetros e suportam pressão até 350 bar, responsáveis pela alta eficiência, sendo de grande versatilidade por permitir o uso de várias fases estacionárias, possibilitando separar e analisar diversos compostos distintos com alta eficiência (DEGANI; CASS; VIEIRA, 2011).

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica para detectar e identificar moléculas de interesse por meio da medição da sua massa. Trata-se de uma importante ferramenta física que caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga de seus íons. Essa técnica analítica frequentemente é empregada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e auxiliar na elucidação estrutural de moléculas (SILVERSTEIN et al., 2006).

VENKATACHALAM et al., 2018 extraiu pigmentos vermelhos da *Talaromyces albobiverticillius*, caracterizando os mesmos pelo sistema cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a espectrometria de massa (MS), utilizando a interface de ionização por eletrospray (ESI). PANDEY et al., 2018 obteve um pigmento laranja do fungo *Penicillium* sp. (GBPI\_P155) e caracterizou parcialmente com os métodos de UV-vis e Espectroscopia de infravermelho com Transformação de Fourier. YANG et al., 2018 em seu trabalho produziu um pigmento amarelo do *Monascus* e caracterizou por HPLC acoplada

a um detector de matriz de fotiodo (PAD) e detector de dispersão de luz evaporativa (ELSD).

## 5 ESTUDO DOS PIGMENTOS FÚNGICOS

Os pigmentos fúngicos podem ser obtidos a partir da fermentação em estado sólido (FES) ou submerso (FmS) (SRIANTA et al. 2016) (Tabela 1). A FES é um método tradicional de fermentação. Em tese, FES aplica-se ao método de crescimento de microrganismos utilizando substratos sólidos próximo da ausência de água livre, sendo, comumente, indicada para cultivo de fungos filamentosos (PANDEY et al., 2000). GERVAIS et al., 2003 relata que provavelmente uma das principais diferenças entre a FES e FmS consiste na capacidade de mistura dos componentes do meio. Neste sentido, a FmS proporciona uma melhor homogeneização dos componentes do meio de cultivo.

A FmS tem como particularidade a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis. Atualmente, este sistema é o mais empregado industrialmente para obtenção de vários metabólitos produzidos pelos fungos, visto que proporciona melhor controle das condições operacionais. Além disso, permite o direcionamento da fermentação de modo a favorecer maiores rendimentos do pigmento (KANG et al., 2014; DIKSHIT et al., 2017).

Ambos processos de cultivo apresentam aspectos positivos e negativos. Neste sentido, a FES oferece algumas vantagens quando comparada a FmS, como: menores riscos de contaminação; possibilidade de emprego de resíduos agroindustriais como substrato; alta produtividade de pigmentos com menor custo; condições mais próximas do *habitat* natural dos microrganismos. Em contrapartida, possui algumas limitações operacionais, como controle da temperatura, do pH, do fornecimento de oxigênio e da homogeneização do meio de cultivo. Antagonicamente, a FmS permite um melhor controle das condições de fermentação, porém com maiores custos (SRIANTA et al., 2016; SOCCOL et al., 2017; PANDEY, 2003).

Muitos metabólitos secundários pigmentados de fungos têm aplicações clínicas potencialmente significativas. O composto mais encontrado na Tabela 1, pertence à classe dos carotenoides e não surpreendentemente, a atividade biológica em destaque foi a antioxidante. Estudos sugerem que tais substâncias possuem um alto potencial de neutralizar

a ação de radicais livres e oxidantes reduzindo o dano oxidativo em biomoléculas, característica de inúmeras doenças inflamatórias (ZANG et al., 2016).

**Tabela 1.** Estudo de pigmentos fúngicos

Autor/ano	País/ Região	Objetivo	Fungo	Condições de cultivo	Métodos de caracterização química	Cor/ Composto químico	Propriedade Biológica	Conclusão
VENKATACH ALAM et al. (2018)	Ilha da Reunião	Produzir e caracterizar parcialmente o pigmento da cepa <i>T.</i> <i>albobiverticillius</i>	<i>Talaromyces</i> <i>albobiverticillius</i> 30548	Submerso	HPLC-PDA-ESI / MS RMN	Vermelho	-	O fungo em estudo é uma fonte em potencial de pigmentos vermelhos livres de citrina.
YOLMEH et al., 2017	Teerã, Irã	Comparar as propriedades antibacterianas e antioxidantes do pigmento extraído de <i>R. glutinis</i> selvagem e suas cepas tratadas com os mutagênicos.	<i>Rhodotorula</i> <i>glutinis</i>	Submerso	-	Carotenoide	Atividade antioxidante e antibacteriana	Os resultados indicam que os pigmentos extraídos de <i>R. glutinis</i> mutante e selvagem podem ser usados como uma fonte adequada de antibiótico natural e antioxidante eficaz
DA COSTA et al., 2017	Campinas, Brasil	Produzir pigmentos do <i>M. ruber</i> CCT 3802 em cultura submersa usando lactose como substrato	<i>Monascus ruber</i> CCT 3802	Submerso	-	Vermelho	-	Estudos futuros poderiam usar lactose em soro de queijo para aplicá-lo na produção de pigmentos por <i>M.</i> <i>ruber</i> .
YANG et al., 2018	-	Investigar a composição do pigmento amarelo <i>Monascus</i> solúvel em água	<i>Monascus ssp</i>	Submerso	HPLC-PAD- ELSD, ESI-MS de alta resolução e MS-MS	Amarelos e monascinas	-	O fungo produz pigmentos amarelos e monascinas solúveis em água

DOS REIS CELESTINO et al. (2014)	Amazonas, Brasil	Isolar fungos capazes de produzir pigmentos.	<i>Penicillium sclerotiorum</i> 2A V2, <i>Penicillium sclerotiorum</i> 2A V6, <i>Aspergillus calidoustus</i> 4BV 13, <i>Penicillium citrinum</i> 2AV18 e <i>Penicillium purpurogenum</i> 2 BV41	Submerso	RMN	Esclerotiorina	-	Esses resultados indicam que a bioprospecção de fungos da Amazônia é um meio viável para buscar novas fontes de corantes naturais.
HERNÁNDEZ -ALMANZA et al. (2014)	EUA	Definir o efeito de diversas condições de cultivo na produção de carotenóides pela cepa de <i>R. glutinis</i> YB-252.	<i>Rodotorula glutinis</i> YB-252	Sólido	UV, HPLC	$\beta$ -caroteno e licopeno	-	Produção de licopeno pela levedura <i>R. glutinis</i> obtida de cultivo em estado sólido representa uma alternativa atraente para a produção de pigmentos microbianos.
SURAIYA et al. (2018)	-	Maximizar a produção de pigmentos naturais de <i>Monascus</i> spp. utili zando <i>Saccharina japonica</i> como substrato de fermentação em estado sólido.	<i>Monascus purpureus</i> KCCM 60168 e <i>Monascus kaoliang</i> KCCM 60154	Sólido	TCL		Proteção do DNA e antioxidante	Concluir que <i>S. japonica</i> foi um substrato muito adequado em condições ótimas para <i>Monascus</i> spp. p rodução de pigmentos naturais.
DU et al., 2016	-	Separar e purificar a astaxantina de <i>P. rhodozyma</i> usando	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Submersa	TLC, espectroscopia por UV, HPLC e ESI / MS / MS	Astaxantina	-	A astaxantina na pureza de 99,0% foi separada com sucesso do extrato

		HSCCC pela primeira vez						bruto de <i>P. rhodozyma</i> usando uma combinação de HSCCC e cromatografia em coluna de sílica gel.
SOUZA et al., 2016	Brasil	Selecionar fungos produtores de pigmento, identificar esses fungos com base em sequências internas de espaçadores transcritos, avaliar o crescimento e a produção de pigmentos das linhagens selecionadas em quatro diferentes meios e caracterizar os principais metabólitos coloridos em seus extratos.	<i>Aspergillus sydowii</i> (CML2967), <i>Aspergillus aureolatus</i> (CML2964), <i>Aspergillus keveii</i> (CML2968), <i>Penicillium flavigenum</i> (CML2965), <i>Penicillium chermesinum</i> (CML2966), <i>Epicoccum nigrum</i> (CML2971), <i>Lecanicillium aphanocladii</i> (CML2970) e <i>Fusarium</i> sp. (CML2969).	Submersa	TLC	oosporein, orevactaene e dihydrotrichodimerol	-	Os resultados indicam que as cepas fúngicas selecionadas podem servir como novas fontes de pigmentos que possuem importantes aplicações industriais.
BULLER et al., 2015	Campinas-SP, Brazil	Estudar a produção de pigmentos pelo fungo <i>Monascus ruber</i> em um biorreator	<i>Monascus ruber</i>	Submersa	-	Amarelo/laranja	-	Este estudo mostra a viabilidade da produção de pigmentos naturais

		utilizando glicerina obtida como subproduto de uma indústria de biodiesel como substrato.						por <i>Monascus ruber</i> em um biorreator usando um coproduto de biodiesel sem tratamento prévio como substrato.
YOO et al., 2016	InCheon, na Coreia do Sul	Produzir e caracterizar um pigmento vermelho pela levedura <i>R. mucilaginosa</i> AY-01.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> AY-01	Submersa	FT-IR, TLC and HPAEC	Vermelho (carotenoide)	Antioxidante e antibacteriana	Foi isolada uma linhagem de carotenoides, sendo este parcialmente purificado usando uma cromatografia de afinidade de metal imobilizado. A glicose foi identificada como o principal monossacarídeo por análise HPAEC. Os carotenoides glicosídicos mostraram as atividades antioxidantes e antibacterianas significativas.

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência; PDA - Detector de conjunto de fotodiodos; ESI-MS- Espectrometria de massas com ionização electrospray; RMN-ressonância Magnética Nuclear; UV- Ultravioleta; TLC - Cromatografia de camada delgada; FT-IR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; HPAEC- Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho.

## REFERÊNCIAS

ALURAPPA, Ramesha et al. Endophytic Fungi and Bioactive Metabolites Production: An Update. In: **Microbial Biotechnology**. Springer, Singapore, 2018. p. 455-482.

ARAÚJO, Joniel Mendes de et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória docarotenoide bixina em ratos submetidos ao modelo de colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico. 2017.

AREFIN, Sayema et al. Tartrazine induced changes in physiological and biochemical parameters in Swiss albino mice, *Mus musculus*. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 3, 2017

BÜHLER, Rose Marie Meinicke et al. Influence of light intensity on growth and pigment production by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 5, p. 1277-1289, 2015.

CARDOSO, Ligia AC et al. Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products. In: **Carotenoids**. InTech, 2017.

DA COSTA, Jaqueline Pires Vital; VENDRUSCOLO, Francielo. Production of red pigments by *Monascus ruber* CCT 3802 using lactose as a substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2017.

DE ALMEIDA BARBOSA, Luiz Claudio. **Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos**. Ed. UFV, 2007.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, 2011.

DIKSHIT, Rashmi; TALLAPRAGADA, Padmavathi. *Monascus purpureus*: A potential source for natural pigment production. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 4, p. 164-174, 2017.

DU, Xiping et al. Separation and purification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by preparative high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1029, p. 191-197, 2016.

DUFOSSE, Laurent et al. 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, Laurent et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 389-406, 2005.

DZOYEM, Jean P. et al. Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 2, p. 251-253, 2017.

ELAASSER, Mahmoud Mohamed; ABDEL-AZIZ, Marwa Mostafa; EL-KASSAS, Rasha Ahmad. Antioxidant, antimicrobial, antiviral and antitumor activities of pyranone derivative obtained from *Aspergillus candidus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 4, p. 5-17, 2017.

ERDEMLI, Mehmet Erman et al. The protective role of crocin in tartrazine induced nephrotoxicity in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 930-935, 2017.

FERRAZ, José Lucas de Almeida Antunes et al. Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. **Bioresource technology**, v. 248, p. 214-220, 2018.

Ghanbari, Tajick; SEID Mohammadkhani, H.; Babaeizad, V. Identification of some secondary metabolites produced by four *Penicillium* species. **Mycologia Iranica**, v. 1, n. 2, p. 107-113, 2014.

GMOSER, Rebecca et al. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal biology and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 4, 2017.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, Ayerim et al. Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. **Food Bioscience**, v. 7, p. 31-36, 2014.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 1-51, 2011.

JIMÉNEZ, Paillière; ELISA, Maria. Produção e caracterização de pigmentos produzidos por *Chryseobacterium* KR6 e *Lysobacter* A03. 2017.

JOSHI, Deepmala et al. Curcuma longa Linn. extract and curcumin protect CYP 2E1 enzymatic activity against mercuric chloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress: A protective approach. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 69, n. 6, p. 373-382, 2017.

KALAI, Safaa et al. Modelling the effect of temperature, pH, water activity, and organic acids on the germination time of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* conidia. **International journal of food microbiology**, v. 240, p. 124-130, 2017.

KANG, Biyu et al. Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. **Enzyme and microbial technology**, v. 55, p. 50-57, 2014.

KINSELLA, John E.; HWANG, Dan H.; DWIVEDI, Basant. Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 2, p. 191-228, 1976.

KINSELLA, John E.; HWANG, Dan. Biosynthesis of flavors by *Penicillium roqueforti*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 18, n. 7, p. 927-938, 1976.

KOBYLEWSKI, Sarah; JACOBSON, Michael F. Toxicology of food dyes. **International journal of occupational and environmental health**, v. 18, n. 3, p. 220-246, 2012.

LE DRÉAN, Gwenola et al. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. **International journal of food microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 100-107, 2010.

LI, Zhen et al. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. **Scientific reports**, v. 6, p. 25313, 2016.

MENDEZ, Alejandro et al. 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.

MPOUNTOUKAS, Panagiotis et al. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2934-2944, 2010.

MURUGESAN, MRA Manimalaand R. Carotenoid pigment production from Yeast: Health benefits and their industrial applications. **IJCS**, v. 5, n. 6, p. 392-395, 2017.

PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003

PANDEY, Ashok; SOCCOL, Carlos R.; MITCHELL, David. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PIRT, S. J.; RIGHELATO, R. C. Effect of growth rate on the synthesis of penicillin by *Penicillium chrysogenum* in batch and chemostat cultures. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 1284-1290, 1967.

PRADO, Marcelo Alexandre; GODOY, Helena Teixeira. Corantes artificiais em a RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Biosynthesis and metabolism. **Food Carotenoids: Chemistry, Biology, and Technology**, p. 24-46.mentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 14, n. 2, 2009.

RAO, Narsing et al. Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1113, 2017.

SANTIAGO, M. A. ; ASSIS, S. A. ; VALASQUES, GILDOMAR L. . Obtenção de proteases e polissacarídeos de interesse industrial a partir de fungos isolados do semi-árido nordestino. In: XV SEMIC da UEFS, 2011, Feira de Santana. **Anais do XV SEMIC da UEFS**, 2011.

SCHEWE, Hendrik et al. High concentrations of biotechnologically produced astaxanthin by lowering pH in a *Phaffia rhodozyma* bioprocess. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 3, p. 319-326, 2017.

SENA, Amanda Reges de et al. Application of Doehlert experimental design in the optimization of experimental variables for the *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) and *Pseudozyma* sp. (CCMB 300) cell lysis. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 761-767, 2012.

SHARMILA, G.; NIDHI, B.; MUTHUKUMARAN, C. Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder. **Industrial crops and products**, v. 44, p. 158-164, 2013.

SILVERSTEIN, ROBERT M.; DE COMPOSTOS ORGÂNICOS, Identificação Espectrométrica. 7ª Edição. **Rio de Janeiro, Editora LTC**, 2006.

SOCCOL, Carlos Ricardo et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, 2017.

SOUZA, P. N. et al. Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. **Microbiology (Reading, England)**, v. 162, n. 1, p. 12-22, 2016.

SRIANTA, Ignatius et al. Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 181-186, 2016.

SURAIYA, Sharmin et al. Enhancement and characterization of natural pigments produced by *Monascus* spp. using *Saccharina japonica* as fermentation substrate. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 729-742, 2018.

TORRES, Fábio Aurélio Esteves et al. Natural colorants from filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2511-2521, 2016.

TULI, Hardeep S. et al. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 8, p. 4669-4678, 2015.

VENIL CK, Khasim Ar, Aruldass Ca, Ahmad Wa. Microencapsulation of flexirubin-type pigment by spray drying. Characterization and antioxidant activity. **International Biodeterioration and biodegradation**. 113;350-356, 2016.

VENKATACHALAM, Mekala et al. Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2018.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

YANG, Haihua et al. Identification of water-soluble *Monascus* yellow pigments using HPLC-PAD-ELSD, high-resolution ESI-MS, and MS-MS. **Food chemistry**, v. 245, p. 536-541, 2018.

YOLMEH, Mahmoud; KHOMEIRI, Morteza. Effect of mutagenesis treatment on antimicrobial and antioxidant activities of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis*. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 10, p. 285-290, 2017.

YOO, Ah Young; Alnaeeli, Mawadda; Park, Jae Kweon. Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 463-473, 2016.

ZHANG, Hua; TSAO, Rong. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33-42, 2016.

## CAPÍTULO II - ARTIGO

### PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE PIGMENTOS FÚNGICOS

#### RESUMO

O presente estudo teve por objetivo extrair, caracterizar parcialmente e avaliar algumas propriedades biológicas de pigmentos biotecnológicos obtidos da levedura *Pseudozyma* CCMB 300 e do fungo filamentoso *Penicillium roqueforti* ATCC 10110. Para ativação de ambas cepas empregou as metodologias de cultivo em estado sólido e submerso. Extração dos pigmentos foi realizada usando o planejamento simplex-centroide. A Espectrofotometria de absorção no Ultravioleta-visível (UV-vis), a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS) foram as técnicas utilizadas para caracterização parcial das frações. Foi determinada a termoestabilidade (10-100°C), a estabilidade sob diferentes pH (2-10) e frente à luz solar (2 h). A atividade antioxidante foi determinada *in vitro* avaliando a capacidade de sequestrar os radicais orgânicos •DPPH e ABTS<sup>•+</sup> e pelo método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico. A atividade antibacteriana foi determinada usando um método de microdiluição com as cepas *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A *Pseudozyma* 300 produziu apenas pigmentos intracelulares, sendo a acetona o melhor solvente extrator. Já o *P. roqueforti*, produziu somente pigmentos extracelulares, sendo o etanol o solvente mais viável para extração. A Fração etanólica do pigmento do *P. roqueforti* (FEPPR) inibiu mais acentuadamente o radical •DPPH (IC<sub>50</sub> 42,22 ± 0,1 µg/mL), além de exibir compostos fenólicos (80,25 ± 0,1 µg EAG/mg). A Fração de acetona do pigmento da *Pseudozyma* 300 (FAPP300) inibiu mais o radical ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> 36,58 ± 0,1 µg / mL). No ensaio antibacteriano apenas a Fração etanólica do pigmento do *P. roqueforti* inibiu a cepa *S. aureus* (CIM 50 µg/mL e CBM 1000 µg/mL). Ambas frações dos pigmentos (FEPPR e FPP300) foram termoestáveis em todas as temperaturas testadas e estabilidade sob a luz solar (2 h). Além disso, a FEPPR apresentou estabilidade em pH neutro e básico. Os resultados encontrados nesse estudo sugerem que a *Pseudozyma* 300 e o *P. roqueforti*, podem ser uma fonte em potencial de pigmentos naturais.

**Palavras-chaves:** solventes extratores, atividade antioxidante, atividade antibacteriana, estabilidade físico-química.

## PRODUCTION, PARTIAL CHARACTERIZATION AND ASSESSMENT OF PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF FUNGAL PIGMENTS

### ABSTRACT

The study aimed to extract, partially characterize and evaluate some biological properties of biotechnological pigments obtained from the yeast *Pseudozyma* CCMB 300 and the filamentous fungus *Penicillium roqueforti* ATCC 10110. For the activation of both strains, it was used the methodologies of culture in solid and submerged state. Pigment extraction was performed using the simplex-centroid planning. Ultraviolet-visible absorption spectrophotometry, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy and High Performance Liquid Chromatography were the techniques used for partial characterization of fractions obtained from crude pigments. Thermostability (10-100 ° C), stability under different pHs (2-10) and sunlight (2 h) were determined. The antioxidant activity was determined in vitro by evaluating the ability of DPPH and ABTS<sup>•+</sup> organic radical scavenging assay and by the co-oxidation method of  $\beta$ -carotene / linoleic acid. The antibacterial activity was determined using a microdilution method against the strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Pseudozyma* 300 produced only intracellular pigments, with acetone being the best solvent extractor. *P. roqueforti*, in contrast, produced only extracellular pigments, with ethanol being the most viable solvent for extraction. The ethanolic fraction of *P. roqueforti* pigment (EFPRP) showed more a stronger inhibition of DPPH (IC42.22  $\pm$  0.1  $\mu$ g / mL) and phenolic compounds (80.25  $\pm$  0.1  $\mu$ g EAG / mg). The acetone fraction of the pigment of *Pseudozyma* 300 (AFPP300) further inhibited the ABTS radical  $\bullet$  + (IC36.58  $\pm$  0.1  $\mu$ g / ml). In the antibacterial assay only the ethanolic fraction of the pigment of *P. roqueforti* inhibited the *S. aureus* strain (MIC 50  $\mu$ g / mL and CBM 1000  $\mu$ g / mL). Both pigment fractions (EFPRP and AFPP300) presented thermostability in all tested temperatures and stability under sunlight (2 h). In addition, the EFPRP showed stability at neutral and basic pH. The results found in this study suggest that *Pseudozyma* 300 and *P. roqueforti* may be a potential source of natural pigments.

**Keywords:** extractive solvents, antioxidant activity, antibacterial activity, physico-chemical stability.

## INTRODUÇÃO

A cor é um item essencial na aceitação sensorial de um produto e, muitas vezes, influencia diretamente na decisão de compra (Venkatachalam et al., 2018). Dados recentes apontaram que os pigmentos naturais representam 31% do mercado de aditivos *versus* 40% dos sintéticos e semissintéticos (Lv et al., 2017). Percebe-se que esse cenário vem se transformando, uma vez que os pigmentos naturais são biodegradáveis e, geralmente, apresentam baixa toxicidade (Lv et al., 2017; Erdemili et al., 2017).

A produção de pigmentos via fungos encontra-se em expansão e apresenta um elevado potencial biotecnológico (Torres et al., 2016). Os pigmentos fúngicos podem ser considerados uma alternativa promissora em relação aos obtidos de animais ou vegetais, visto que apresentam alta versatilidade no crescimento e nas condições operacionais (Buller et al., 2015). Os pigmentos naturais além de colorir podem ser considerados ingredientes funcionais, pois, na maioria das vezes, possuem biocompostos com diversas propriedades biológicas, incluindo atividade antioxidante e antibacteriana (Li et al., 2013; Yolmeh et al., 2017).

Nesta perspectiva, diversos autores têm utilizado fungos para produção de pigmentos, como Yolmeh et al., (2017) que extraiu pigmentos carotenoides de *Rhodotorula glutinis* com atividade antibacteriana sob a bactéria *Staphylococcus aureus* (2 mg/mL). Morales-Oyervides et al., (2015) produziu pigmentos vermelhos do *Penicillium purpurogenum*, sendo estes termoestáveis até 80 °C e instáveis em pH ácidos. Yooh et al., 2016 obteve um pigmento carotenoide glicosídico da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, o qual mostrou uma atividade antioxidante sob o radical ABTS de 82 % (2 mg/mL).

A *Pseudozyma 300* é uma levedura típica da região do semiárido nordestino e já foi utilizada biotecnologicamente para produção de enzimas líticas e inulinases (Assis et al., 2014; Sena et al., 2012). O fungo filamentoso *P. roqueforti* é característico da França e as diversas pesquisas realizadas com o mesmo são, geralmente, para produção de enzimas (Ferraz, et al., 2018; Li et al., 2010). Assim, apesar do interesse biotecnológico já descritos da *Pseudozyma 300* e do *P. roqueforti*, são escassos trabalhos em que há utilização destes para a produção de pigmentos naturais, o que evidencia a originalidade do presente estudo.

Nesta perspectiva, diante da maior conscientização dos consumidores sobre os efeitos nocivos dos corantes sintéticos, as indústrias farmacêuticas e alimentícias estão buscando cada vez mais aditivos de fontes naturais (Yolmeh et al., 2017). Portanto, o objetivo deste trabalho consiste na extração, caracterização química parcial e avaliação das potencialidades biológicas de pigmentos biotecnológicos utilizando as cepas *Pseudozyma* CBMM 300 e *P. roqueforti* ATCC 10110 como fonte deste biocomposto.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Microrganismos**

A levedura *Pseudozyma* CCMB 300 foi obtida da Coleção Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB) (Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasi) e o fungo filamentosso *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, foi adquirido da Coleção de Cultura de Microrganismos do INCQS/Fiocruz (Farmanguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) isolado do queijo Roqueforti Francês, nos Estados Unidos da América. Ambas as cepas foram repicadas em placas contendo o meio Ágar Batata Dextrose (PDA), incubadas a 28°C em estufa BOD (SL200/90 Incubadora - SOLAB) por 5 dias e, posteriormente, mantidas a 4°C.

### **Cultivo em estado sólido**

O meio de cultivo PDA (Ágar Batata Dextrose) foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e vertido em placas de Petri de aproximando-te 100 mm. Após a solidificação dos meios de cultivo nas placas, com auxílio de uma ponteira estéril de micropipeta (0,5 mm), as cepas foram inoculadas através da imersão da ponteira na suspensão de esporos dos fungos e posterior toque no centro de cada placa contendo o meio de cultura. As placas inoculadas foram incubadas a 28°C em estufa BOD (SL200/90 Incubadora - SOLAB) por 5 dias (Buller et al., 2015).

### **Cultivo Submerso**

As cepas *Pseudozyma* 300 e *P. roqueforti* foram inoculados em placas contendo o meio PDA (Ágar Batata Dextrose) previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos. As placas contendo os microrganismos foram incubadas a 28°C em estufa BOD (SL200/90 Incubadora - SOLAB) por 5 dias (Buller et al., 2015). Após esse período, foi realizado o cultivo submerso em frascos de erlenmeyer (250 mL) contendo: 15 g/L de D-glucose, 2 g/L

de  $\text{KH}_2(\text{PO}_4) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , e pH final de 6.5. Os frascos foram inoculados com 3 discos de aproximadamente 2 cm de diâmetro com os microrganismos. O cultivo foi conduzido por 96 horas, sob agitação de 0,161 g e temperatura à 30°C. Após o período de cultivo o meio contendo as cepas foi filtrado à vácuo (Bomba de filtro vácuo TE- 0582) a fim de obter a biomassa (Manera et al., 2011). A biomassa foi seca em estufa à 50 °C até peso constante.

### **Extração dos pigmentos**

#### **Extração do pigmento extracelular com o planejamento centroid-simplex**

As colônias do *P. roqueforti* e da *Pseudozyma* 300 foram cuidadosamente raspadas da superfície do meio PDA, com o auxílio de uma espátula previamente esterilizada. Posteriormente, as amostras foram colocadas em tubos e adicionada com o solvente de acordo com o planejamento contido na Tabela 1, na proporção 1:1, a fim de extrair o pigmento extracelular. Para extração máxima dos pigmentos, as amostras foram colocadas em banho ultrassônico por aproximadamente 6 minutos. Por fim, foi realizada filtração em papel filtro Whatman n.º 1 previamente pesado. O filtrado que apresentou maior unidade de absorvância, foi deixado em repouso à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Posteriormente, o pigmento bruto extraído (200 mg) foi submetido ao fracionamento em coluna sílica-gel utilizando hexano, acetato de etila e etanol como eluentes. Apenas a fração com pigmento foi utilizada para os experimentos subsequentes.

#### **Extração do pigmento intracelular com o planejamento centroid-simplex**

A biomassa seca (3 g) foi macerada em grau e pistilo e, posteriormente, ressuspensa em tampão fosfato pH 7,0, sendo agitada em vórtex por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados às amostras, o solvente (acetona, etanol e DMSO) de acordo com o planejamento contido na Tabela 1, na proporção 1:1, a fim de extrair o pigmento intracelular. Por fim, o pigmento bruto extraído foi separado por extração Líquido-Líquido usando éter etílico para separação da fração contendo o pigmento. O pigmento extraído foi deixado em repouso, à temperatura ambiente ao abrigo de luz, a fim de volatilizar o solvente ficando apenas o pigmento extraído.

### **Quantificação de pigmentos**

As frações dos pigmentos foram quantificadas usando espectrofotômetro, sendo a concentração de pigmento da *Pseudozyma 300* e do *P.roqueforti* estimadas pela medida da absorbância dos filtrados a 450 nm (pigmentos amarelos) e 560 nm (pigmentos verdes), respectivamente. Os pigmentos produzidos foram expressos em Unidades de Absorbância (UA) (Buller et al., 2015).

### **Caracterização química**

A varredura em UV-vis foi realizada no espectrofotômetro, com o intervalo de comprimento de onda entre 200 e 800 nm. A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (modelo Varian Inova 500) foi utilizada para medição espectral na faixa de frequência de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com um total de 20 varreduras. As amostras também foram analisadas utilizando um cromatógrafo UPLC Acquity acoplado a um espectrômetro de massa TQD Acquity (Micromass-Waters), com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo para o pigmento do *P. roqueforti* e no modo positivo para o pigmento da *Pseudozyma 300*. A coluna utilizada foi Phenomenex Luna C-18 (250x4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e as fases móveis foram ácido fórmico em água 0,1% (fase A) e acetonitrila (fase B). A temperatura do forno foi 40°C e as condições ESI foram: capilar = 4500 V, gás de secagem = 8 L/min, pressão do nebulizador = 2 bar, temperatura da fonte = 200°C, com aquisição de dados entre  $m/z$  50 e 1000. Os constituintes das amostras foram sugeridos pela comparação de seus valores  $m/z$  e padrões de fragmentação com a literatura.

### **Estabilidade dos pigmentos**

A estabilidade dos pigmentos foi realizada seguindo o método de Suraiya et al. (2018). O primeiro conjunto de tubos de ensaio contendo 3 mL de pigmentos foi incubado durante 1 h a diferentes temperaturas (10-100 °C) usando banho-maria. O segundo conjunto de tubos de ensaio contendo 3 mL de pigmentos foi ajustado com tampão fosfato em diferentes pHs (2-10). O terceiro conjunto de tubos de ensaio contendo 3 mL de pigmentos foi deixado sob luz solar por 2 horas.

### **Quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu**

A concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras foi determinada pelo ensaio espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. As amostras foram diluídas nos seus respectivos solventes (acetona e etanol) para uma concentração final de 1 mg/mL. Uma alíquota de 125  $\mu$ L da amostra foi misturada com 125  $\mu$ L do reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de água destilada. Após 3 min, 125  $\mu$ L da solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  foi adicionada e incubada por 30 min a 37°C. Ao final da incubação, a absorbância da amostra foi medida espectrofotometricamente em 750 nm. Uma curva padrão de ácido gálico (0,5 a 25  $\mu$ g) foi construída para quantificação dos compostos fenólicos totais nas amostras, os quais foram expressos em  $\mu$ g equivalentes de ácido gálico por miligramas de amostra ( $\mu$ g EAG/mg) (Singleton et al., 1999).

### **Detecção de alcaloides pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD)**

Alíquotas das frações dos pigmentos foram aplicadas no ponto de origem de três cromatoplasmas de sílica-gel (dimensões 5x10 cm) com auxílio de tubos capilares e eluídas em cuba de vidro fechada contendo uma mistura de clorofórmio e metanol (9:1). Após a corrida cromatográfica ascendente, as placas foram secas e observadas sob luz de ultravioleta (UV) em 365 nm. Por fim, o reagente de DRG (Reativo de Dragendorff) foi pulverizado nas placas para revelar a presença dos alcaloides (Costa et al., 2008).

### **Atividade antioxidante**

As atividades antioxidantes dos pigmentos foram avaliadas usando três métodos: captação de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Duarte-Almeida et al., 2006; Santos et al., 2017) e descoloração do  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  (2,2'-azino- ensaios (3- etilbenzotiazolino-6-sulfônico ácidos) (Rufino et al., 2007; Santos et al., 2017) e pelo método de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (Miller et al., 1971).

Para o ensaio de DPPH alíquotas de 12,5-150  $\mu$ L das amostras foram misturadas com 1700  $\mu$ L de solução etanólica de DPPH (50  $\mu$ M). Etanol foi empregado para completar o volume da reação para 2 mL. As misturas reacionais foram incubadas por 20 min à 25°C e a absorbância residual do  $\cdot\text{DPPH}$  foi medida a 517 nm. No ensaio de descoloração do  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ , o cátion radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  foi preparado pela reação do sal ABTS (7 mM) com

persulfato de potássio (2,45 mM) e repouso da mistura no escuro à temperatura ambiente por 16 h antes do uso (Rufino et al., 2007). A solução ABTS<sup>•+</sup> foi diluída com metanol (absorbância de 0,35 em 734 nm) e incubada com as amostras (12,5-200 µL) em um volume final de 2 mL. A absorbância foi medida a 734 nm após 6 min a 25°C. Vitamina C e Trolox foram utilizados como controles positivos e os valores de inibição foram expressos como a concentração de amostra necessária para reduzir 50% dos radicais livres (IC<sub>50</sub>).

No ensaio de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico, primeiramente foi feita uma emulsão composta por 60 µL de ácido linoleico, 10 µL da solução β-caroteno (20 mg/mL), 1 mL de clorofórmio e 530 µL de Tween 40. Posteriormente, essa mistura foi rotaevaporada para completa evaporação do clorofórmio. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se água aerada até obter absorbância inicial de 0,65 a 470 nm. Dois mililitros da mistura de β-caroteno/ácido linoleico foram misturados com amostras à 74 µg/mL e incubadas a 50°C durante 2 horas. A leitura da absorbância da mistura reacional foi determinada imediatamente e após 2 h de incubação em 470 nm (Miller, 1971). Trolox foi utilizado como controle positivo.

### **Determinação da Atividade Antibacteriana**

As atividades antibacterianas dos pigmentos foram verificadas através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) de acordo Santos et al., 2017. A atividade antibacteriana dos pigmentos foi testada frente as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

As suspensões bacterianas foram diluídas em caldo BHI até 0,1 de absorbância em 625 nm. Em seguida, as amostras de pigmentos foram adicionadas em concentrações variadas (50 a 1000 µg/mL) com as bactérias (5x10<sup>5</sup> UFC/mL) num volume final de 200 µL. Após incubação a 37°C por 24 h, foi adicionado 60 µL do corante resazurina (0,01%) em 200 µL de suspensão bacteriana. A CIM foi considerada a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano visível (cor azul) após incubação adicional de 30 min a 37°C. Para a determinação do CBM, 10 µL da suspensão bacteriana pré-incubados com as frações em diferentes concentrações (50 a 1000 µL/mL) foram plaqueados em ágar Muller-Hinton a 37°C por 24 h. A CBM foi considerado a concentração onde não houve evidência de

crescimento bacteriano na superfície do meio de cultura. O antibiótico ceftriaxona (50 µg/mL) foi utilizado como controle positivo para ambos ensaios.

### **Ensaio de citotoxicidade**

Inicialmente os pigmentos (FAPP300 e FEPPR) foram diluídos em DMSO puro estéril na concentração de 10 mg/mL. As células MCF-7 (carcinoma de mama humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL contendo o meio RPMI 1640 suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Fundamentalmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (100 µL/poço de uma solução de 0,3 x 10<sup>6</sup> células/mL para células em suspensão e 0,7 x 10<sup>5</sup> células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, as substâncias testes dissolvidas em DMSO nas concentrações de 0,19-50 µg/mL foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. Quatro horas (vinte e quatro horas para o PBMC) antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. A doxorubicina e DMSO foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa. A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas IC<sub>50</sub> realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 6.0. (O'brien et al., 2000; Ahmed et al., 1994).

### **Análise estatística**

Todos os testes foram realizados, no mínimo, em triplicata e expressos como média ± desvio padrão amostral. Os dados foram analisados utilizando ANOVA uma via e Dunnett como pós-teste. Todos os testes foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism (6.0). Foi adotado o nível de significância de 5% (p<0,05). O planejamento de mistura simplex-centroide foi gerado pelo programa Estatística 10.0.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

### Produção e Extração dos Pigmentos

Sabe-se que a produção de pigmentos fúngicos pode ser realizada por meio do cultivo em estado sólido ou submerso, sendo esta uma etapa crucial para obtenção de maiores rendimentos dos compostos (Sharmila et al., 2013; Srianta et al. 2016). Neste estudo, a levedura *Pseudozyma* 300 produziu pigmentos apenas na fermentação submersa ( $\cong$  40 mg/mL). Uma hipótese é que seus pigmentos permanecem intracelularmente devido elevada hidrofobicidade. Esse processo fermentativo vem sendo bastante utilizado, visto que permite um melhor controle das condições operacionais. O fungo filamentosso *P. roqueforti* gerou pigmentos exclusivamente no cultivo sólido (400mg/mL). Tal método ainda é bastante usual, uma vez que possui boas rentabilidades e baixo custo.

Os fungos que produzem pigmentos intracelulares, como a *Pseudozyma* 300, necessitam, geralmente, da combinação de métodos mecânicos e químicos para extração. Neste sentido, a permeabilização celular consiste na técnica mais usual para promover a ruptura celular, a qual modifica a estrutura da membrana citoplasmática promovendo a liberação de biocompostos intracelulares. Alguns solventes têm sido largamente descritos para a permeabilização de células, como etanol, isopropanol, butanol e acetona (Monks et al. 2013).

No intuito de identificar as melhores condições para a extração do pigmento, visto que a literatura é bastante limitada em estudos de condições ótimas de extração, foi necessária a aplicação da metodologia de superfície de resposta (RSM) para determinar as condições ótimas de extração dos pigmentos. Esta ferramenta estatística é amplamente utilizada para otimizar as condições de extração e reduzir número de experimentos necessários (Lai et al., 2013). Os solventes utilizados no processo de extração foram escolhidos seguindo uma ordem de polaridade, com a finalidade de verificar de forma ampla as interações intermoleculares do biocomposto com o solvente.

Neste trabalho, observa-se que a acetona e o etanol foram os solventes que apresentaram maiores influências na extração do pigmento intracelular da *Pseudozyma* 300 (0,384 UA<sub>450</sub>) e extracelular do *P. roqueforti* (2,745 UA<sub>560</sub>), respectivamente. Assim, possivelmente ambos pigmentos tratam de compostos de caráter hidrofílicos, visto que as melhores condições de extração estavam dentro da faixa de maiores proporções de etanol e acetona. Além disso, a acetona e o etanol são solventes menos tóxicos e de rápida volatilização.

A combinação dos três solventes (acetona, DMSO e etanol) na proporção de 0,333% não resultou em melhorias na eficiência da extração dos pigmentos de ambas as cepas, sendo este um dado importante na redução de custos no processo de extração. Pois, quanto mais contaminantes na amostra, maior seria a necessidade de lançar mão de técnicas de purificação que podem tornar mais oneroso o processo de obtenção da amostra na forma pura. Compostos voláteis como acetona e etanol podem ser separados facilmente com temperaturas brandas por evaporação, entretanto, o DMSO precisaria de técnicas mais apuradas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou até extração Líquido-Líquido usando diferentes tipos de solventes.

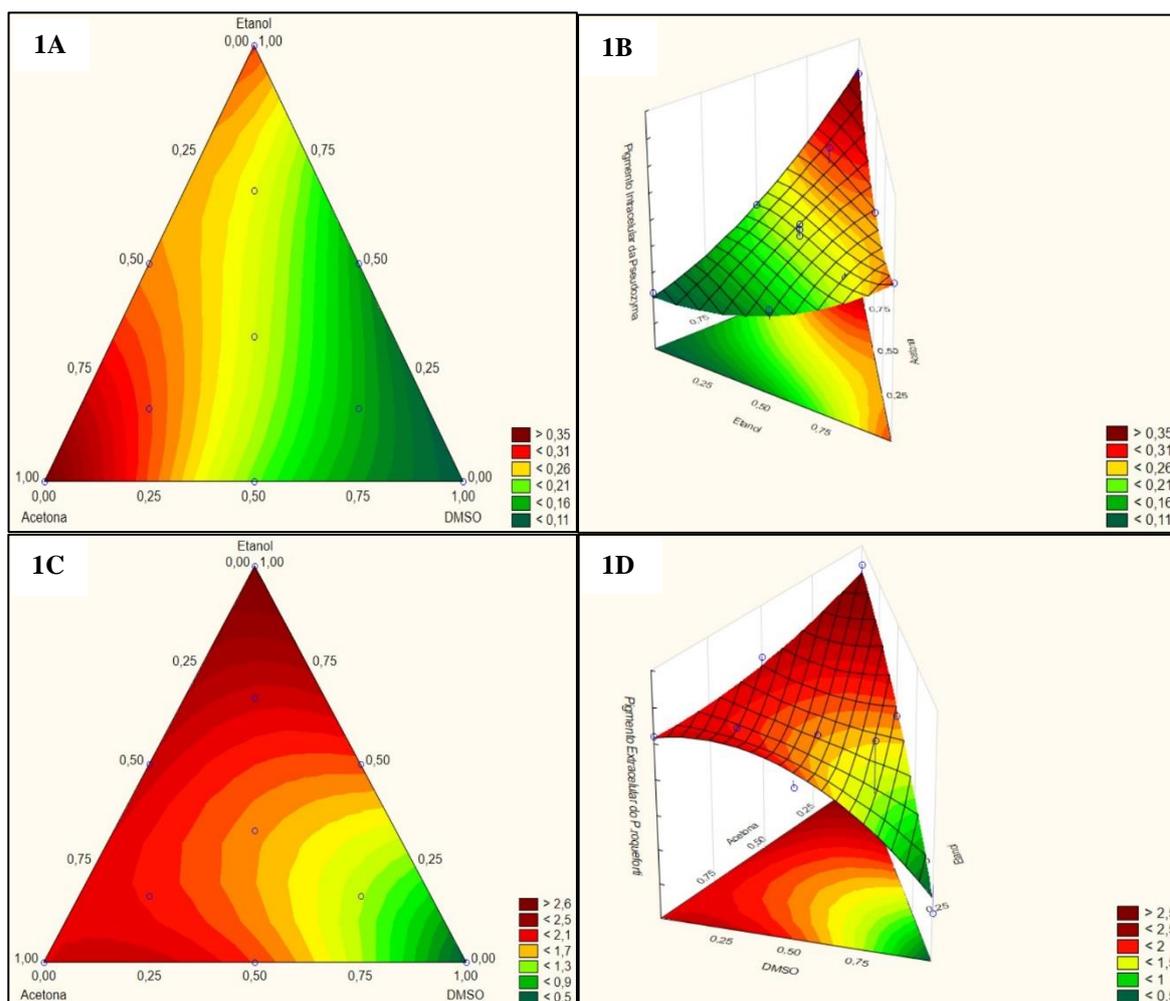
**Tabela 1.** Matriz de design do planejamento simples-centroide aplicado para extração dos pigmentos intracelulares e extracelulares da *Pseudozyma* e do *P. roqueforti*.

	Acetona	DMSO	Etanol	QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS (UA)			
				Pigmento Extracelular da <i>Pseudozyma</i>	Pigmento Intracelular da <i>Pseudozyma</i>	Pigmento Extracelular do <i>P.roqueforti</i>	Pigmento Intracelular do <i>P. roqueforti</i>
1	0,500000 (1/2)	0,500000 (1/2)	0,000000 (0)	-	0,205	1,687	-
2	0,500000 (1/2)	0,000000 (0)	0,500000 (1/2)	-	0,269	2,300	-
3	0,333333 (1/3)	0,333333 (1/3)	0,333333 (1/3)	-	0,236	1,560	-
3	0,333333 (1/3)	0,333333 (1/3)	0,333333 (1/3)	-	0,245	1,687	-
3	0,333333 (1/3)	0,333333 (1/3)	0,333333 (1/3)	-	0,223	1,656	-
4	0,000000 (0)	0,000000 (0)	1,000000 (1)	-	0,298	2,745	-
5	0,166667 (1/6)	0,666667 (2/3)	0,166667 (1/6)	-	0,123	2,100	-
6	0,666667 (2/3)	0,166667 (1/6)	0,166667 (1/6)	-	0,315	2,000	-
7	0,000000 (0)	0,500000 (1/2)	0,500000 (1/2)	-	0,163	1,730	-
8	0,166667 (1/6)	0,166667 (1/6)	0,666667 (2/3)	-	0,226	1,954	-
9	1,000000 (1)	0,000000 (0)	0,000000 (0)	-	0,384	2,115	-
10	0,000000 (0)	1,000000 (1)	0,000000 (0)	-	0,112	0,200	-

Os gráficos de área e superfície da extração do pigmento da *Pseudozyma* 300 estão apresentados na Figura 1A e 1B, respectivamente. Avaliando o modelo linear proposto é visível que existe uma tendência em direção à região da acetona (Figura 1A). Sendo assim, sugere-se que para obtenção de maiores rendimentos do pigmento de *Pseudozyma* 300 o

ideal é usar apenas a acetona como solvente, pois além de apresentar melhor capacidade de extração do pigmento, é bastante volátil, diferente do DMSO e do etanol. As Figuras 1C e 1D, representam os gráficos de área e superfície da extração dos pigmentos do *P. roqueforti*, respectivamente. Neste sentido, de acordo com modelo linear proposto existe uma tendência em direção ao etanol, indicando que este consiste no melhor solvente extrator.

**Figura 1.** Gráficos das Superfícies de respostas das extrações dos pigmentos em função das variáveis independentes etanol, acetona e DMSO.



1A. Gráfico de superfície da extração do pigmento do *Pseudozyma 300* em função das variáveis independentes etanol, acetona e DMSO. 1B. Gráfico de área da extração do pigmento do *Pseudozyma 300* em função das variáveis independentes etanol, acetona e DMSO. 1C. Gráfico de superfície da extração do pigmento do *P. roqueforti* em função das variáveis independentes etanol, acetona e DMSO. 1D. Gráfico de área da extração do pigmento do *P. roqueforti* em função das variáveis independentes etanol, acetona e DMSO.

A Tabela 2A mostra que o valor de F tabelado (6,25) foi menor que F calculado (14,37) para regressão e F tabelado maior (19,00) que F calculado (5,51) para falta de ajuste,

mostrando quem o modelo para a extração do pigmento da *Pseudozyma* está bem ajustado. A Tabela 2B mostra que valor de F tabelado (4,77) foi menor que F calculado (7,04) para regressão e F tabelado maior (39,87) que F calculado (19,16) para falta de ajuste, mostrando que o modelo para a extração do pigmento do *P. roqueforti* apresentou falta de ajuste, entretanto esse achado não inviabiliza o modelo, visto que o mesmo demonstrou ser robusto e apresentou boa reprodutibilidade. Além do mais, o modelo experimental proposto de extração para os pigmentos de ambas as cepas em estudo demonstrou que aproximadamente 95% dos resultados podem ser explicados por este planejamento (Tabela 2A e 2B).

**Tabela 2. 2A.** ANOVA para análise de variância e regressão para o modelo de extração do pigmento da *Pseudozyma* 300. **2B.** ANOVA para análise de variância e regressão para o modelo de extração do pigmento do *P. roqueforti*.

**2A.**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F Calculado	F Tabelado	R <sup>2</sup>
Regressão	0,028663	5	0,005732627	14,37	6,25	0,94
Resíduo	0,001595	4	0,000398742			
Falta de ajuste	0,001350	2	0,000675	5,51	19,00	
Puro erro	0,000245	2	0,000122			
SQ total	0,030258	9	0,003362			

**2B.**

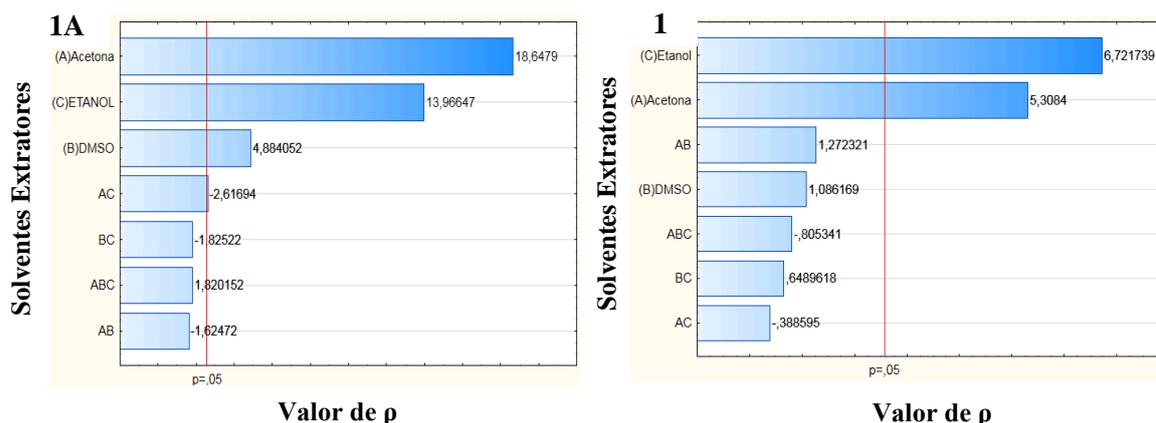
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F Calculado	F Tabelado	R <sup>2</sup>
Regressão	3,879644	9	0,431071552	7,04	4,77	0,95
Resíduo	0,183600	3	0,061199899			
Falta de ajuste	0,174831	1	0,174831	39,87631	19,16429	
Puro erro	0,008769	2	0,004384			
SQ total	4,063244	11	0,369386			

SQ: Soma quadrática; gl: Graus de liberdade; MQ: Média Quadrática

O gráfico de Pareto permite verificar a influência de cada parâmetro (etanol, acetona e DMSO) e suas interações, podendo ser observadas em ordem decrescente de significância (Figura 1). Desta forma, de acordo com a Figura 2A pode-se inferir que todos os solventes influenciaram na extração do pigmento da *Pseudozyma* 300, já que o resultado apresentou estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Além disso a acetona estatisticamente consiste no melhor solvente extrator deste pigmento da *Pseudozyma* 300. Já para na extração do pigmento do *P. roqueforti* apenas o etanol e a acetona, mostraram-se significativos ( $p < 0,05$ ),

sendo que o etanol mostrou melhor influência estatisticamente (Figura 2B). As combinações entre os solventes (acetona, etanol e DMSO) não exibiram dados estatísticos significativos para extração de ambos pigmentos.

**Figura 2.2A.** Gráfico de Pareto mostrando a influência dos solventes Acetona, Etanol e DMSO na extração do pigmento da *Pseudozyma* 300. **2B.** Gráfico de Pareto mostrando a influência dos solventes Acetona, Etanol e DMSO na extração do pigmento do *P. roqueforti*.



### Influência da glicose na produção dos pigmentos em cultivo submerso

A produtividade de pigmentos por microrganismos em cultivo submerso é diretamente influenciada pela composição do meio de cultivo (Nigam et al., 2016). Segundo Manan et al., 2017 concentrações elevadas de glicose no meio de cultivo podem reduzir a formação de pigmento, na maioria das vezes, devido à predominância do metabolismo fermentativo em que ocorre aumento da produção de etanol e as inibições das enzimas da cadeia respiratória.

Nesta perspectiva, este estudo visou avaliar o efeito da glicose na produção de pigmentos numa faixa de 5-25 g/L. Os melhores resultados alcançados para produção de pigmentos pela *Pseudozyma* 300 em cultivo submerso foram encontrados com 15 g/L de glicose no meio de cultivo (Tabela 3). Este dado corrobora com os achados literários que recomendam o uso da glicose abaixo de 20 g/L no meio de cultura (Manan et al., 2017).

**Tabela 3.** Matriz experimental da produção de pigmentos intracelulares da *Pseudozyma* 300

Glicose (g/L)	QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS (UA)
5	0,05
10	0,158
15	0,384
20	0,234
25	0,103

### Caracterização dos pigmentos

Inicialmente os extratos brutos dos pigmentos obtidos da *Pseudozyma* 300 e do *P. roqueforti* foram fracionados por partição líquido-líquido e coluna cromatográfica, respectivamente, com intuito de identificar o composto responsável pela atividade biológica e facilitar abordagens mais mecánísticas.

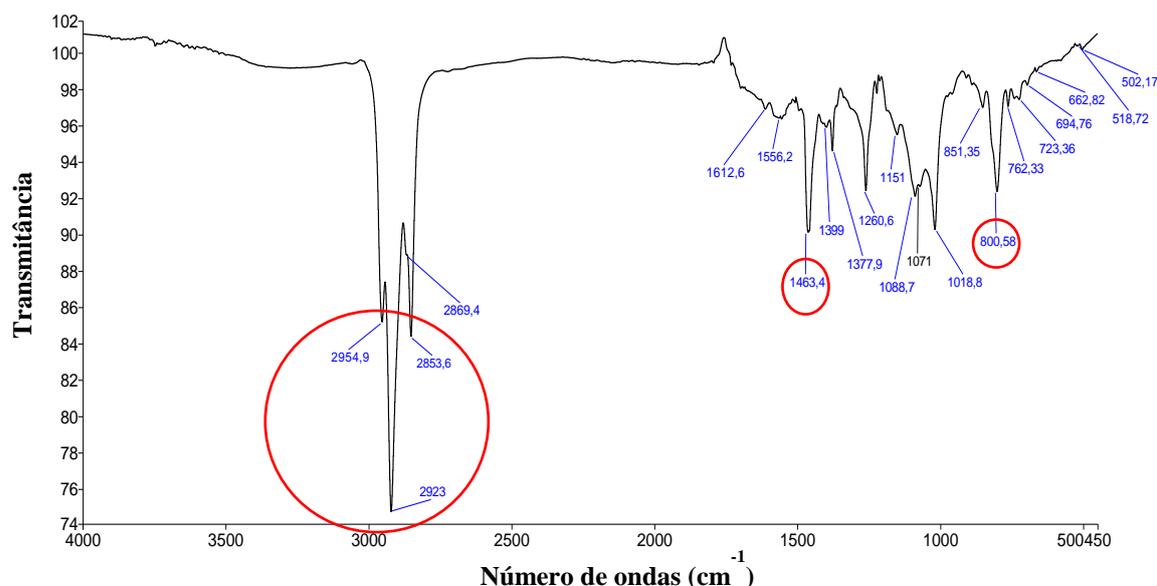
A caracterização química de compostos orgânicos contribui para um maior conhecimento da sua natureza química, permitindo identificar a estrutura do composto responsável por uma determinada atividade biológica, além de ser considerado um marcador químico para a espécie. Neste contexto, após extração os pigmentos da *Pseudozyma* 300 e do *P. roqueforti* foram fracionados por partição líquido-líquido. A Fração de acetona do pigmento da *Pseudozyma* 300 (FAPP300) e a Fração etanólica do pigmento do *Penicillium roqueforti* (FEPPR) foram submetidos à análise de varredura em espectrofotômetro (UV-vis) na faixa de 200 a 800 nm, apresentando picos de absorbância máximo na região de 450 nm e 500 nm, respectivamente. Tais comprimentos de onda são característicos de pigmentos amarelos e verdes, respectivamente, o que não é surpreendente, uma vez que estas são as cores das amostras em estudo.

Vale ressaltar que os espectros dos diversos compostos são muito vezes semelhantes, sendo necessário complementar a identificação do pigmento utilizando outros métodos de caracterização (Amorim-Carrilho et al., 2014). Além disso, a técnica espectrofotométrica UV-vis é capaz de verificar características estruturais da molécula, no entanto não identifica grupos funcionais, como a técnica de espectroscopia no infravermelho.

A espectroscopia de infravermelho é importante para a interpretação da capacidade de ligação estrutural, afinidade e sítios de íons metálicos no pigmento, sendo assim, os espectros dos pigmentos foram obtidos na faixa de 400 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ . O pigmento da *Pseudozyma* 300 exibiu estiramentos em 2923, 2853, 1463, 800 nm (Figura 3). A faixa de

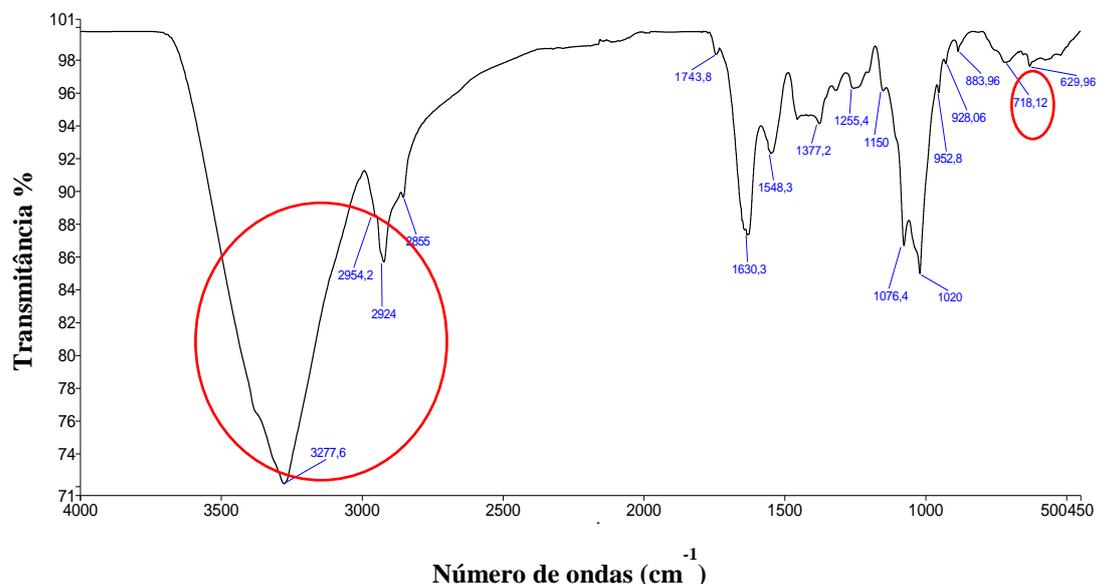
absorção entre 2850-3000  $\text{cm}^{-1}$  representa várias bandas de estiramentos simétricos e assimétricos de ligações C-H de grupos  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  e CH de alcanos e grupos alquila. A absorção em 1465  $\text{cm}^{-1}$  representa o dobramento do  $\text{CH}_2$  (de Almeida Barbosa, 2007).

**Figura 3.** Espectro do pigmento da *Pseudozyma* 300 no infravermelho com transformada em Furrier



O pigmento do *P. roqueforti* exibiu estiramentos em 3277, 2924, 1830, 1076 e 1020 nm (Figura 4). A faixa de absorção entre 2250-3400  $\text{cm}^{-1}$  representa várias bandas de estiramentos de hidrocarbonetos, álcoois e fenóis associados por ligação de hidrogênio intramolecular. Além disso nessa região mostrou também bandas de ácidos carboxílicos. A absorção em 718  $\text{cm}^{-1}$  representa o dobramento da hidroxila (de Almeida Barbosa, 2007).

**Figura 4.** Espectro do pigmento do *P. roqueforti* no infravermelho com transformada em Furrier.



Em seguida, as frações em estudo também foram analisadas por espectrometria de massas com ionização positiva e negativa para a FAPP300 e FEPPR, respectivamente. Os íons com  $m/z$  304,30, 284,33, 332,33, 326,38, 515,33, 537,37 e 205,31 foram os mais proeminentes na FAPP300 (Tabela 4 e Figuras 5 a 10). Os íons com  $m/z$  537,31 (Figura 9) sugere a presença de  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno na amostra com base em comparações com estudos anteriores (Rivera et al., 2014; Rodrigues et al., 2014; Huck et al., 2000). Por fim, não foi encontrado na literatura nenhum metabólito correspondente ao íon  $m/z$  205, 284, 326, 332, 515 e 304.

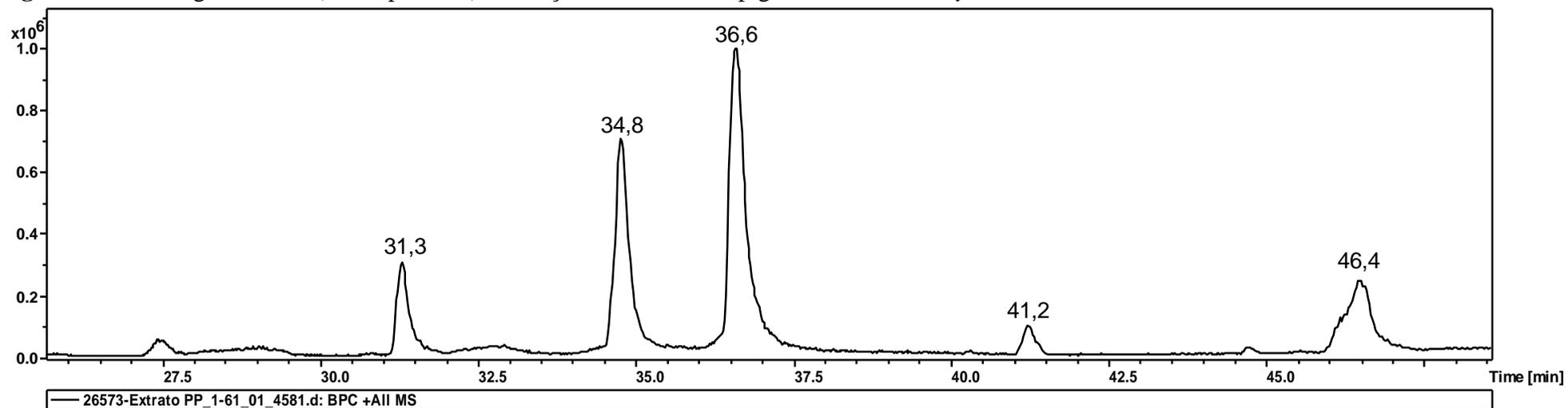
**Tabela 4.** Tempos de retenção e fragmentos dos principais íons majoritários encontrados no pigmento d *Pseudozyma* 300 por CLAE-EM/EM no modo positivo.

Amostra	TR	[M-H] <sup>+</sup>	Fragmentos	Classe/Compostos
	31,3	304,30	65,03; 91,05; 212,23	n.d
	34,8	284,33	60,08	n.d
		332,33	65,03; 91,05; 240,26	n.d
FAPP300	36,6	326,38	58,06; 85,10; 186,22	n.d
	41,2	515,33	60,04; 106,05; 153,12; 240,15	n.d
		537,31	110,02; 128,03; 262,14; 280,15	$\beta$ -caroteno
	46,4	205,08	65,03; 121,02; 149,02	n.d

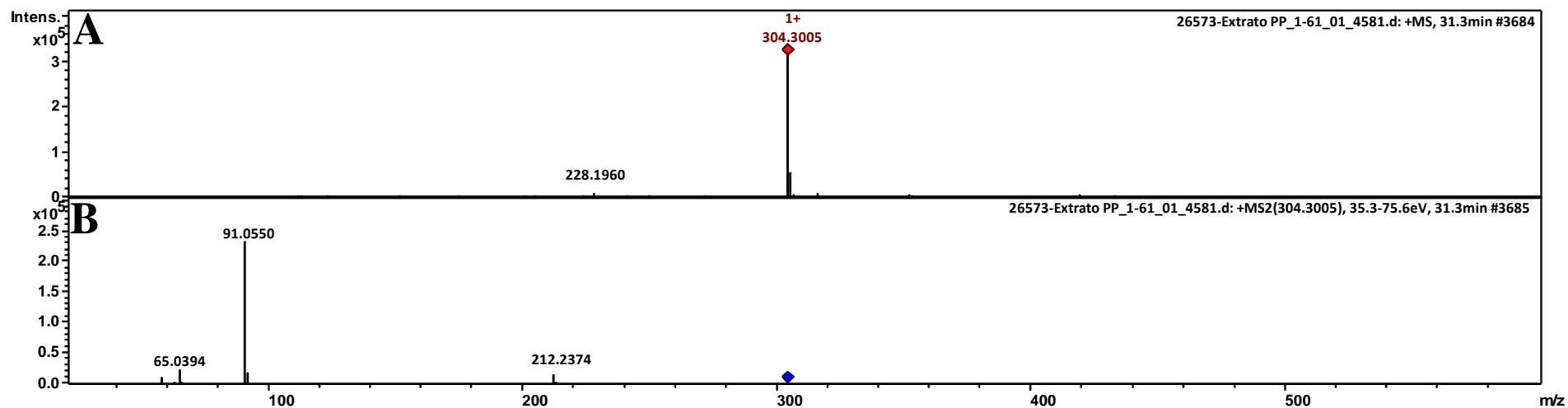
FAPP300-Fração acetona da *Pseudozyma* 300. Os íons majoritários e seus respectivos fragmentos foram retirados das Figuras 5 a 10. (TR): Tempo de retenção. (n.d): não identificado.

O UHPLC-MS- MS vem sendo bastante utilizado para analisar compostos naturais (Venkatachalam et al., 2018), no entanto apresenta limitações em termos de identificação de substâncias atípicas. Deste modo, a caracterização evidente dos composto correspondente ao íon  $m/z$  537 pode ser possível após o seu isolamento e posterior análise utilizando outros métodos espectrométricos, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

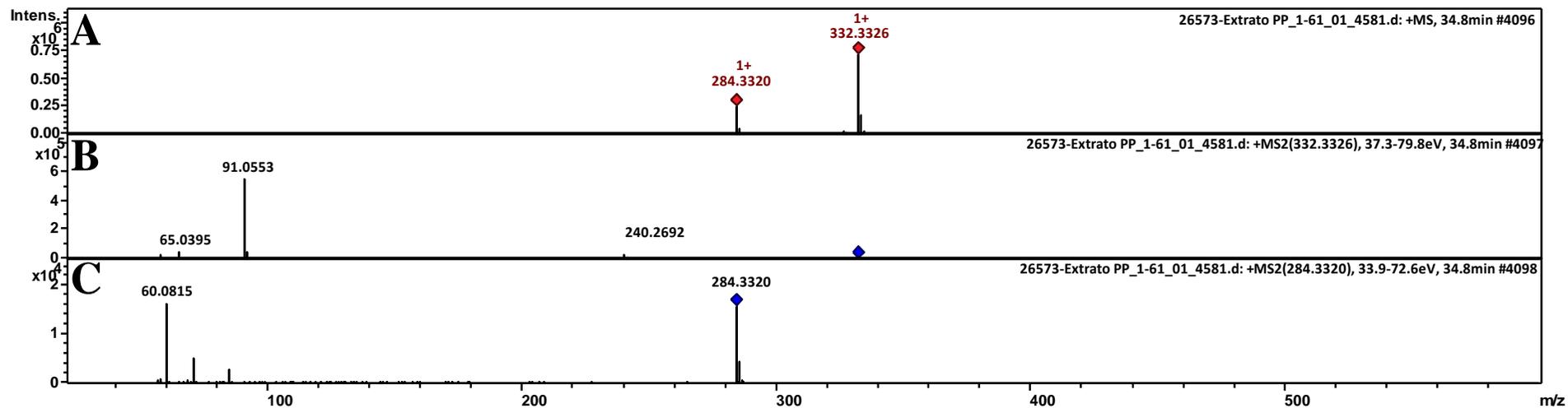
**Figura 5.** Cromatograma total (modo positivo) da Fração de acetona do pigmento da *Pseudozyma* 300.



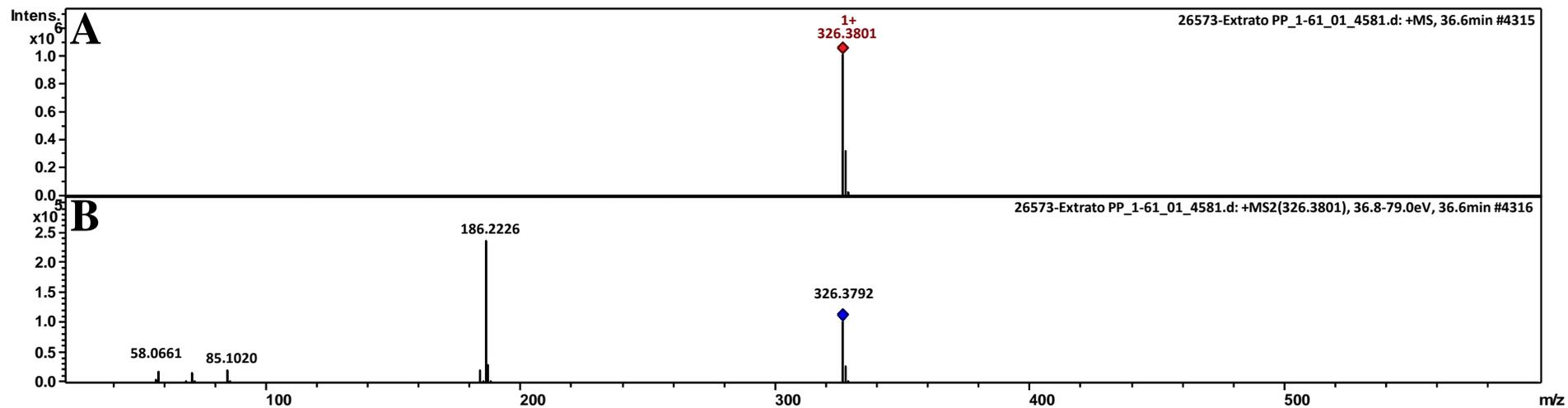
**Figura 6.** Espectro de massas (A) e fragmentos dos íons com m/z (B) identificados em 31,3 min.



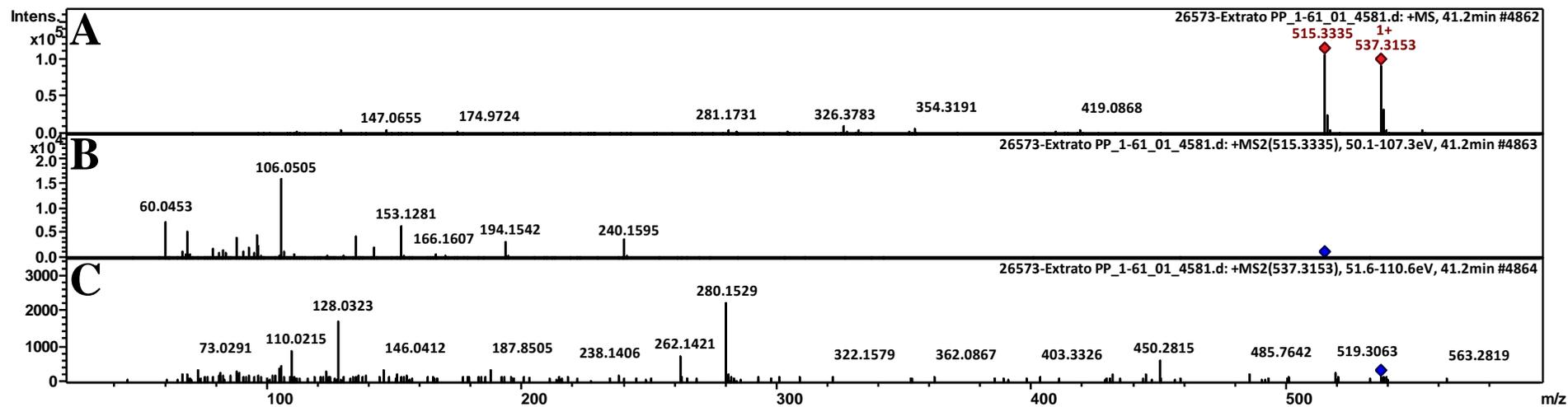
**Figura 7.** Espectro de massas (A) e fragmentos dos íons com m/z (B e C) identificados em 34,8 min.



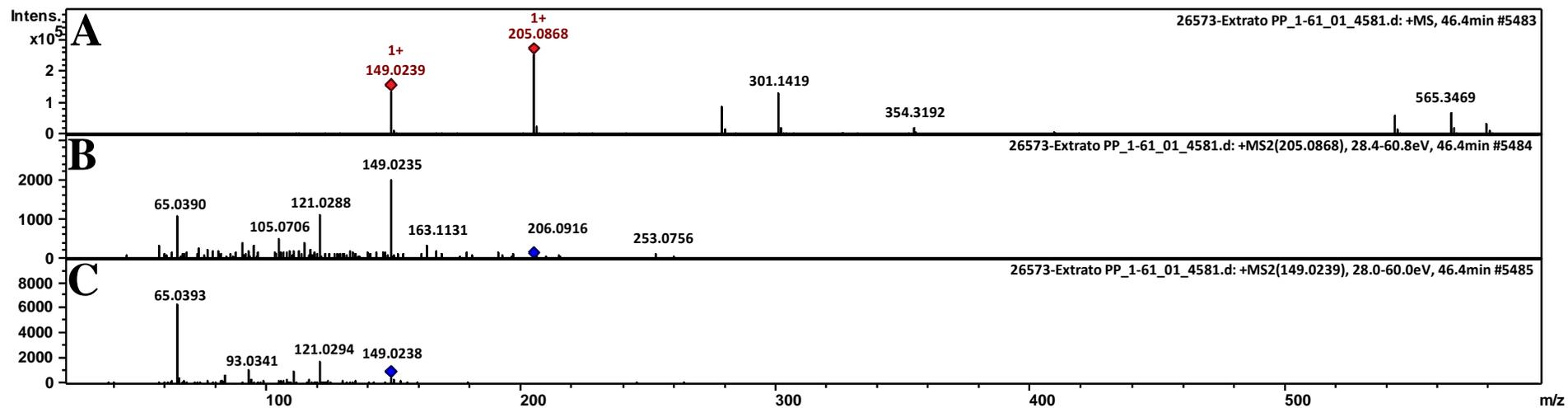
**Figura 8.** Espectro de massas (A) e fragmentos dos íons com m/z (B) identificados em 36,6 min.



**Figura 9.** Espectro de massas (A) e fragmentos dos íons com m/z (B e C) identificados em 41,2 min.



**Figura 10.** Espectro de massas (A) e fragmentos dos íons com m/z (B e C) identificados em 46,4 min.



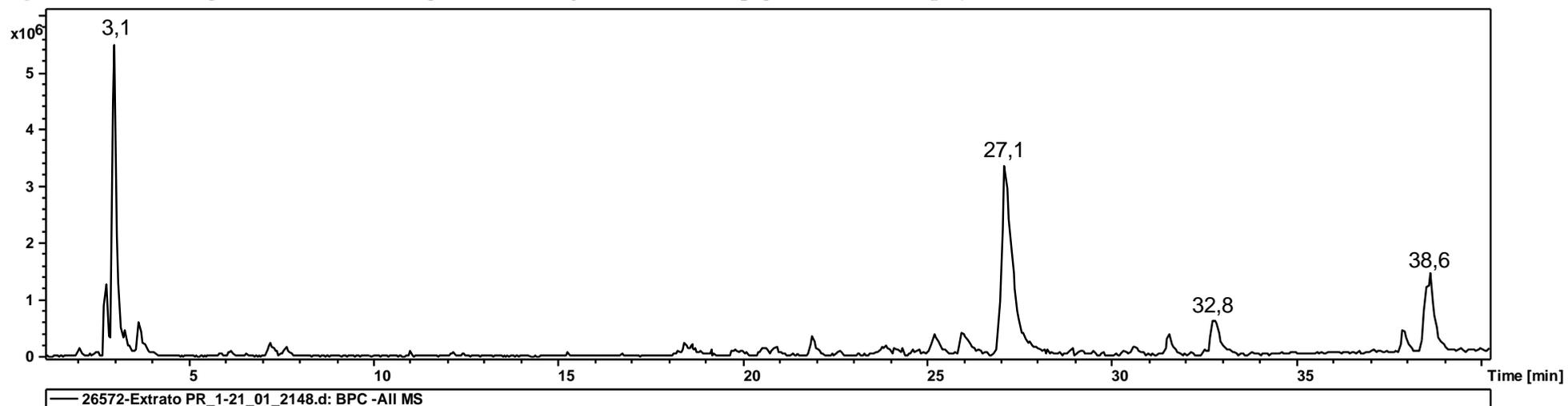
O espectro de massas com ionização negativa da FEPPR apresentou como íons  $m/z$  387, 719, 333, 667, 687, 507, 553, 537 de forma mais acentuados (Tabela 5 e Figuras 11-16). O íon com  $m/z$  537 e seus respectivos fragmentos (Figura 16) são indicativos de Ácido litospérmico A (Barros et al.,2013). Além disso, o íon  $m/z$  719 assemelha-se ao ácido sagerínico (Barros et al.,2013).

**Tabela 5.** Tempos de retenção e fragmentos dos principais íons majoritários encontrados no pigmento do *P. roqueforti* por CLAE-EM/EM no modo negativo.

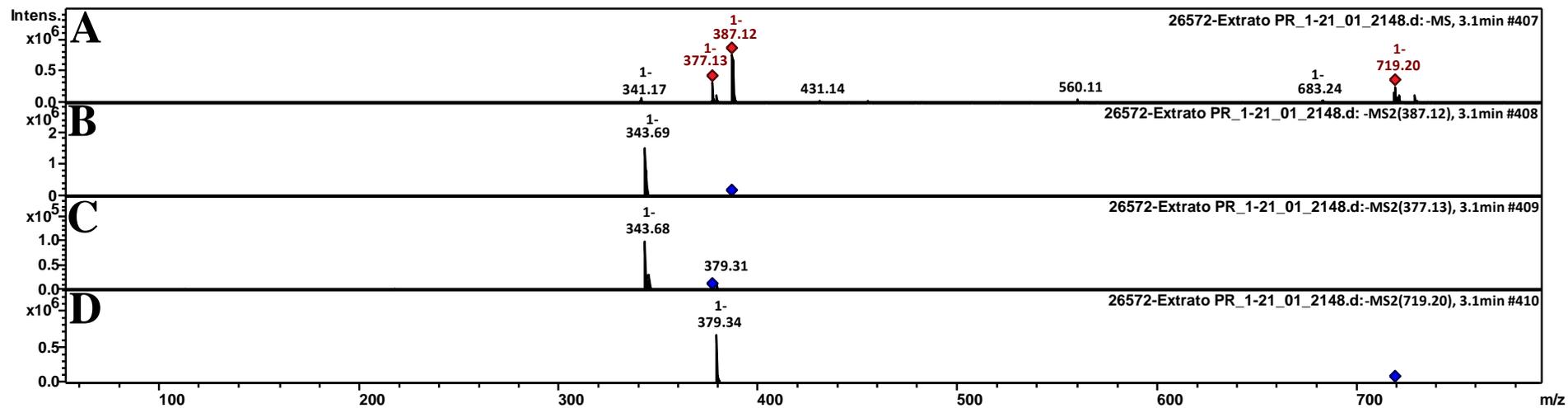
Amostra	TR	[M-H] <sup>-</sup>	Fragmentos	Classe/Compostos
FEPPR	3,1	387,12	343,69; 377,13	n.d
		719,20	379,34	Ácido sagerínico
	27,1	333,11	120,73; 167,44; 212,03	n.d
		667,12	212,01; 335,72	n.d
	32,8	687,13	313,53; 357,53	n.d
		507,31	263,86; 381,63; 403,27	n.d
	38,6	553,22	508,38; 543,28	n.d
		537,32	491,33; 492,54; 527,27	Ácido litospermico A

FEPPR- Fração etanólica do pigmento do *P. roqueforti*. Os íons majoritários e seus respectivos fragmentos foram retirados das Figuras 5 a 10. (TR): Tempo de retenção. (n.d): não identificado. Ácido litospérmico

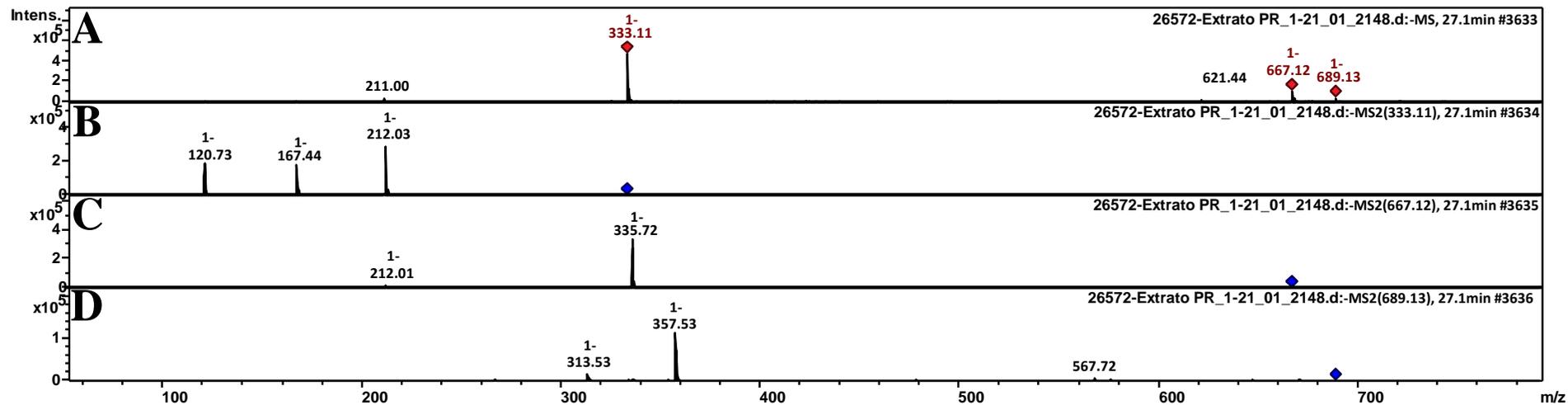
**Figura 11.** Cromatograma total (modo negativo) da Fração etanólica do pigmento do *P. roqueforti*.



**Figura 12.** Espectro de massas (A) e fragmentos dos íons com m/z (B, C e D) identificados em 3,1 min.



**Figura 13.** Espectro de massas (A) e fragmentos dos íons com m/z (B, C e D) identificados em 27,1 min.



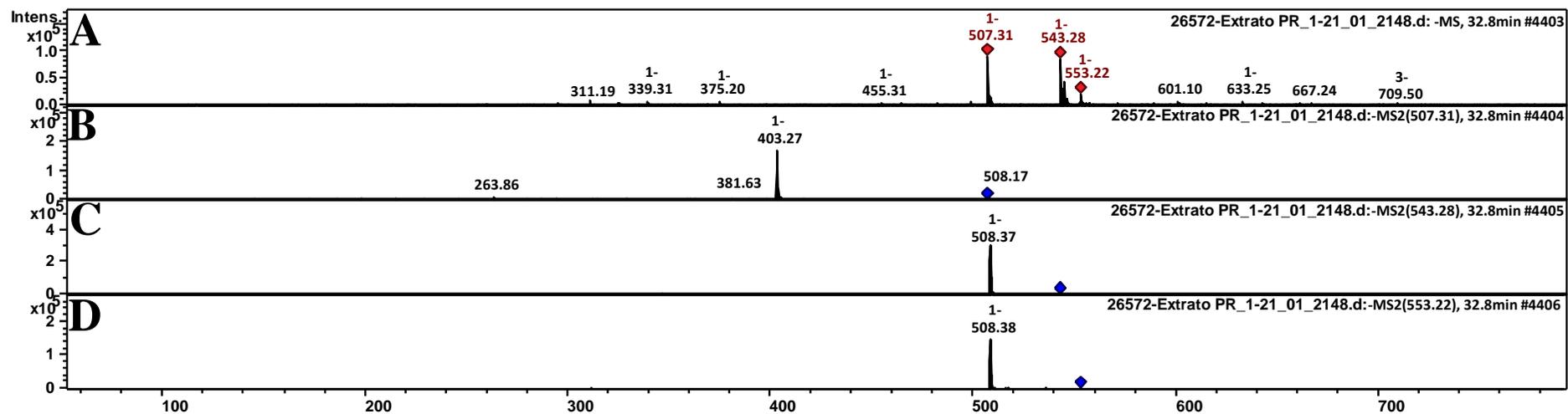
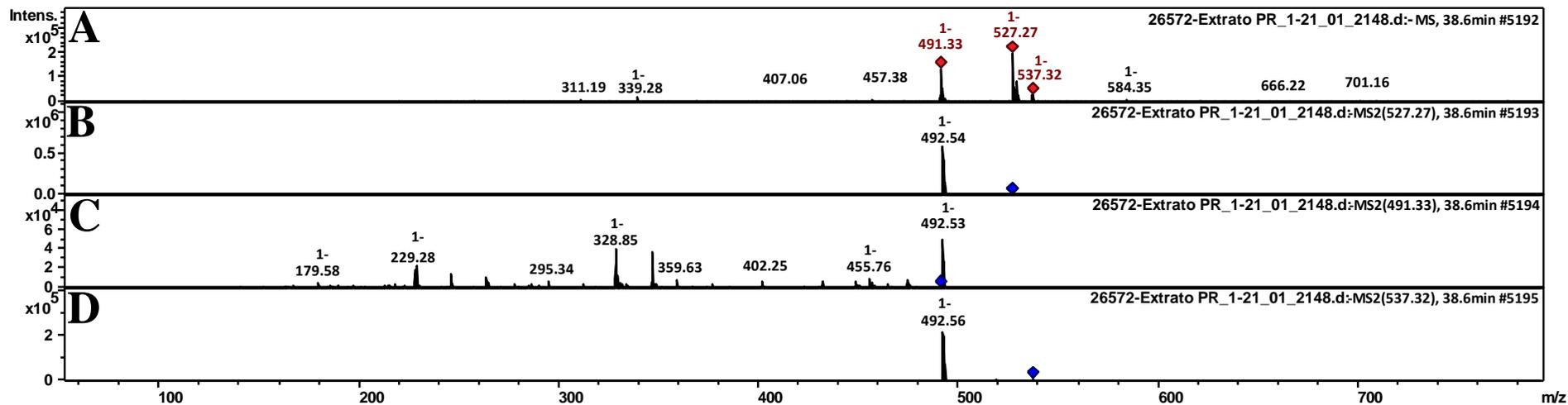
**Figura 14.** Espectro de massas (A) e fragmentos dos íons com m/z (B, C e D) identificados em 32,8 min.

Figura 15. Espectro de massas (A) e fragmentos dos íons com m/z (B) identificados em 38,6 min.



### Estabilidade dos pigmentos

A estabilidade química dos pigmentos naturais é o foco principal de muitos estudos atuais, isso devido sua ampla possibilidade de aplicações industriais (Morales-Oyervides et al., 2015). Previamente, o pigmento deve ser estudado quanto ao efeito dos diferentes fatores que comprometem sua integridade na matriz alimentar durante o processamento, como altas temperaturas, luz e pH (Patras et al., 2010).

Nesta perspectiva, os pigmentos em estudo foram avaliados quanto à sua estabilidade em diferentes temperaturas (10-100°C) e pHs (2-10) e sensibilidade sob a luz solar por 2 horas. A FEPPR e a FAPP300 apresentaram termoestabilidade em todas as temperaturas testadas (10-100°C) e não exibiram sensibilidade à luz. Além disso, a FEPPR permaneceu com a cor inalterada em pH básico e neutro (Tabela 6).

**Tabela 6.** Estabilidade dos pigmentos das frações dos pigmentos da *Pseudozyma* 300 e do *P. roqueforti*

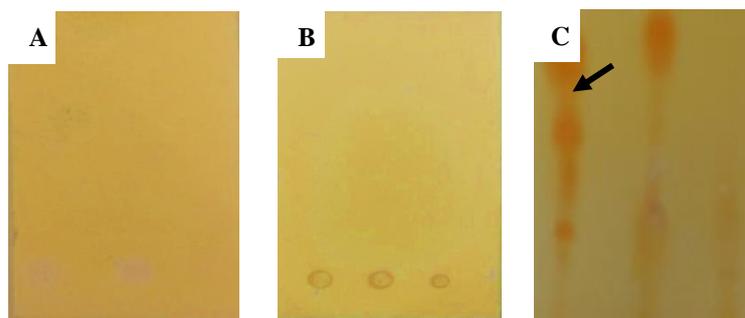
Amostras	Termoestabilidade (10-100°C)	Fotossensibilidade (2 h)	Estabilidade sob pHs
FAPP300	Sim	Não	Instável
FEPPR	Sim	Não	Estável (pH básico e neutro)

FEPR-Fração etanólica do pigmento *P. roqueforti*; FAP300-Fração acetona da *Pseudozyma* 300.

### Avaliação da atividade antioxidante

As frações FAPP300 e FEPPR dos pigmentos inicialmente foram submetidas ao ensaio de quantificação de compostos fenólicos totais (Tabela 7) e detecção de alcaloides (Figura 17). A concentração de fenólicos e outros redutores (Tabela 7) das frações dos pigmentos foram determinadas através da comparação dos achados com uma curva de calibração de ácido gálico (equação da reta  $y = 0,0657x - 0,0132$ ;  $R^2 = 0,997$ ). Apenas a FEPPR indicou presença de compostos fenólicos ( $80,25 \pm 0,1 \mu\text{g GAE/mg}$ ) (Tabela 7). As frações também foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) quanto à presença de alcaloides. A Figura 17 mostra que ambas frações dos pigmentos não apresentaram metabólitos que reagem com o reativo de Dragendorff, o que sugere que estes pigmentos não possuem a presença de alcaloides.

**Figura 17.** Detecção de alcaloides pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD)



A seta indica a mancha que contém alcaloides. A) FAPP300: Fração de acetona do pigmento da *Pseudozyma* 300. B) FEPPR: Fração etanólica do pigmento do *P. roqueforti*. C) controle positivo. Fase estacionária: sílica gel camada de 1,0 mm de espessura. Fase móvel: clorofórmio e metanol. Revelador de Dragendorff.

Recentemente, há um grande interesse na busca por substâncias antioxidantes, principalmente a partir de recursos naturais (Oliveira, 2015). As propriedades antioxidantes de compostos naturais podem ser determinadas utilizando inúmeros métodos, sendo os radicais livres DPPH<sup>·</sup> e ABTS<sup>·+</sup> os mais comumente usados para avaliar essa capacidade *in vitro* (Shalaby & Shanab, 2013).

Diante do potencial biológico dos pigmentos naturais, as propriedades antioxidantes dos pigmentos foram avaliadas através do método de redução dos radicais livres (DPPH<sup>·</sup>, ABTS<sup>·+</sup>) e inibição do branqueamento com  $\beta$ -caroteno. Todas as amostras exibiram alguma atividade sequestradora de radicais contra DPPH<sup>·</sup> e ABTS<sup>·+</sup> (Tabela 7), sendo a FEPPR mais efetivo na redução do radical DPPH<sup>·</sup> (IC<sub>50</sub> 42,22±0,1  $\mu$ g/mL) e a FAPP300 inibiu mais acentuadamente o radical ABTS<sup>·+</sup> (IC<sub>50</sub> 36,58±0,2  $\mu$ g/mL) (Tabela 7). A atividade antioxidante encontrada nesse estudo mostrou ser mais promissoras comparado a estudos de pigmentos fúngicos, como o pigmento carotenoide obtido da cepa *Sporidiobolus pararoseus* DAGIII (IC<sub>50</sub> de 449,11  $\mu$ g/mL) (Saha et al. 2015).

Estudos sugerem que os compostos fenólicos são responsáveis, muitas vezes, pelas propriedades redutoras de espécies radicalares. Possivelmente, isso deve-se ao fato da sua natureza polifenólica, bem como, seu sistema altamente conjugado com múltiplos grupos hidroxilas, tornando estes compostos bons doadores elétrons ou de átomos de hidrogênio (Zang et al., 2016). Neste contexto, a FEPPR apresentou compostos fenólicos (80,25±0,1  $\mu$ g GAE/mg) como relatado anteriormente, sugere-se, portanto, que este possa ser o composto responsável por sua atividade redutora frente aos radicais DPPH<sup>·</sup> e ABTS<sup>·+</sup>. Além disso, seu

espectro do infravermelho da FEPPR apresentou algumas hidroxilas (OH) na faixa de absorção 2250-3400cm<sup>-1</sup> (Figura 4), as quais, geralmente, desempenham papéis fundamentais nas neutralizações de espécies radiculares, muitas vezes, responsáveis por danos moleculares.

A peroxidação lipídica é um processo complexo que ocorre nas células aeróbias e reflete a interação entre o oxigênio molecular e os ácidos graxos poli-insaturados. Sabe-se que os radicais livres participam da peroxidação lipídica que, via de regra, causa a deterioração dos alimentos, o envelhecimento e a promoção do câncer.

Neste contexto, as amostras foram avaliadas pelo método de branqueamento de  $\beta$ -caroteno. De acordo com os resultados obtidos, apenas a fração FAPP300 (1 mg/mL) inibiu o branqueamento  $\beta$ -caroteno em torno de 52 $\pm$ 0,3 %, possivelmente devido à presença do  $\beta$ -caroteno na amostra (Tabela 7). Uma vez que nesse método o meio reacional constitui-se em uma emulsão, por conseguinte, as substâncias com menor polaridade possuem maiores capacidades para permanecerem na interface óleo/água da emulsão, local em que ocorre a peroxidação lipídica e, assim, exercer sua ação antioxidante, como foi o caso da FAPP300 que possivelmente possui como metabólito principal o  $\beta$ -caroteno. Diferentemente, as frações com maiores polaridades, solubilizam-se na fase aquosa e reduz sua atividade, o que fundamenta a inatividade da FEPPR (Koleva et al., 2002).

**Tabela 7.** Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das frações dos pigmentos da *Pseudozyma* 300 e do *P. roqueforti*

Amostras	Compostos Fenólicos Totais $\mu\text{g EAG/mg}$	DPPH <sup>•</sup> IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABTS <sup>•+</sup> IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Co-oxidação do ácido linoleico/ $\beta$ -caroteno (% I)
FEPPR	80,25 $\pm$ 0,1	42,22 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	46,25 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	-
FAPP300	-	51,25 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	36,58 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	52,0 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
Trolox		19,30 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>		83,69 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>
Vitamina C			18,22 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	

FEPPR-Fração Etanólica do *P. roqueforti*; FAP300-Fração acetona da *Pseudozyma* 300. (-) não apresentou atividade. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre as amostras pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett,  $p < 0,05$ . Resultados exibem os valores de IC<sub>50</sub> e do desvio padrão obtido a partir de três experimentos independentes pelos métodos de captura dos radicais DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico obtidos por regressão não-linear. Vitamina C e trolox foram usados como controle positivo.

### Avaliação da atividade antibacteriana

Os microrganismos, especialmente os fungos, são fontes promissoras de biocompostos. Numerosos medicamentos comercializados e utilizados atualmente na prática

clínica são derivados de metabólitos secundários produzidos por fungos. *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são particularmente importantes, pois frequentemente estão associados a infecções nosocomiais e têm resistência aumentada a muitos antibióticos clinicamente disponíveis, estimulando, assim, a busca de tratamentos alternativos (Sampaio et al. 2013).

De acordo com este estudo, apenas a fração do pigmento FEPPR exibiu atividade bactericida frente *S. aureus*, um bacilo Gram-positivo (CIM=50 µg/mL) (Tabela 8). Tal resultado mostra-se bastante promissor quando comparado com outros da literatura, como pigmentos carotenoides obtidos da *Rhodotorula glutinis* que apresentou CIM de 2 mg/mL sob *S. aureus*.

**Tabela 8.** Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (MBC) das frações dos pigmentos da *Pseudozyma* 300 e do *P. roqueforti*

Amostras	CIM (µg/mL)		CBM (µg/mL)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
FAPP300	-	-	-	-
FEPPR	50	-	1000	-
Ceftriaxona	50	50	50	50

FEPPR-Fração etanólica do pigmento do *P. roqueforti*; FAPP300-Fração acetona do pigmento da *Pseudozyma* 300. (-) valores de inibição > 1000 µg/mL.

### Ensaio de citotoxicidade

A atividade antiproliferativa da FAPP300 e a FEPPR sobre as células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), MCF7 (carcinoma de mama humano) e HCT116 (carcinoma de cólon humano) foi investigada. Segundo o programa de triagem de drogas citotóxicas da Fiocruz, frações com valores de IC<sub>50</sub> < 30 µg/mL são considerados promissores (Suffness e Pezzuto, 1990; Boik, 2001). Assim, na triagem preliminar, nenhuma das amostras testadas (FAPP300 e FEPPR) exibiu atividade citotóxica promissora (Tabela 9).

**Tabela 9** – Valores de IC<sub>50</sub> para a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais *versus* não tumorais.

Amostras	MCF-7	HepG2	MRC-5
FAPP300	>50	>50	>50
FEPPR	>50	>50	>50
DOX	1,52	0,20	1,61
	1,10 – 2,09	0,12 – 0,34	0,95 – 2,72

FEPPR-Fração etanólica do pigmento do *P. roqueforti*; FAPP300-Fração acetona do pigmento da *Pseudozyma* 300. Resultados exibem os valores de IC<sub>50</sub> obtido a partir de três experimentos independentes.

## CONCLUSÃO

Portanto, diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que a *Pseudozyma 300* e *P. roqueforti* são possíveis potenciais fontes de pigmentos naturais na cor amarela e verde, respectivamente. Neste estudo, pela primeira vez, comprovou-se que ambos pigmentos possuem atividade antioxidante e são estáveis em diferentes temperaturas e sob a luz solar. Além disso, a FEPPR exibiu atividade bactericida e bacteriostática frente a cepa *S. aureus*. Os dados preliminares sobre a composição química das frações FAPP300 e FEPP00 sugerem a presença de carotenoides e compostos fenólicos, respectivamente, apesar de que investigações futuras voltadas ao isolamento dos metabólitos dos pigmentos são imprescindíveis para uma caracterização mais fidedigna do perfil químico.

## Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores são gratos ao Prof Dr Raphael Ferreira Queiroz, por generosamente fornecer seu laboratório para realização de alguns ensaios. Os autores também agradecem ao Hospital A.C. Camargo pela doação das células tumorais.

## REFERÊNCIAS

Ahmed, S.A., Gogal, R.M., Walsh, J.E., 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods*. 170, 211–224.

Ahmed, S.A., Gogal, R.M., Walsh, J.E., 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods*. 170, 211–224.

Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 56(1), 49-73.

Assis, S. A., Nascimento, D. S., Lima, D. M., Junior, G. V., de Queiroz Oliveira, R., Fernandes, P., ... & Góes-Neto, A. (2014). Production, Characterization and Application of Inulinase from *Pseudozyma* sp. CCMB 300. *Journal Of Advances In Biotechnology*, 4(2), 382-392.

Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food chemistry*, 136(1), 1-8.

Boik, J., 2001. Natural compounds in cancer therapy. Oregon Medical Press, Minnesota, USA, p. 25.

Bühler, R. M. M., Müller, B. L., Moritz, D. E., Vendruscolo, F., de Oliveira, D., & Ninow, J. L. (2015). Influence of light intensity on growth and pigment production by *Monascus ruber* in submerged fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(5), 1277-1289.

Costa, H. N. R. D., Santos, M. C. D., Alcântara, A. F. D. C., Silva, M. C., França, R. C., & Piló-Veloso, D. (2008). Chemical constituents and antiedematogenic activity of *Peltodon radicans* (Lamiaceae). *Química Nova*, 31(4), 744-750

de Almeida Barbosa, L. C. (2007). *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*. Ed. UFV.

Duarte-Almeida, J. M., Novoa, A. V., Linares, A. F., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2006). Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(4), 187.

Erdemli, M. E., Gul, M., Altinoz, E., Zayman, E., Aksungur, Z., & Bag, H. G. (2017). The protective role of crocin in tartrazine induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *96*, 930-935.

Ferraz, J. L. D. A. A., Souza, L. O., Soares, G. A., Coutinho, J. P., de Oliveira, J. R., Aguiar-Oliveira, E., & Franco, M. (2018). Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. *Bioresource technology*, *248*, 214-220.

Huck, C. W., Popp, M., Scherz, H., & Bonn, G. K. (2000). Development and evaluation of a new method for the determination of the carotenoid content in selected vegetables by HPLC and HPLC—MS—MS. *Journal of chromatographic science*, *38*(10), 441-449.

Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., Groot, A., Evstatieva, L.N., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* *13*, 8-17.

Li, N., & Zong, M. H. (2010). Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *66*(1-2), 43-54.

Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., ... & Hu, S. (2016). A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific reports*, *6*, 25313.

Lv, J., Zhang, B. B., Liu, X. D., Zhang, C., Chen, L., Xu, G. R., & Cheung, P. C. K. (2017). Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. *Journal of bioscience and bioengineering*, *124*(4), 452-458.

Manan, M. A.; Mohamad, R.; ARIFF, A. *Monascus spp.: A source of Natural Microbial Color through Fungal Biofermentation J Microbiol Exp.*, v. 5, n. 3, 2017.

Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *48*(2), 91-91.

Monks, L. M., Rigo, A., Mazutti, M. A., Oliveira, J. V., & Valduga, E. (2013). Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *2*(2), 165-169.

Morales-Oyervides, L., Oliveira, J. C., Sousa-Gallagher, M. J., Méndez-Zavala, A., & Montañez, J. C. (2015). Effect of heat exposure on the colour intensity of red pigments produced by *Penicillium purpurogenum* GH2. *Journal of Food Engineering*, *164*, 21-29.

Nigam, P. S., & Luke, J. S. (2016). Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Current Opinion in Food Science*, *7*, 93-100.

O'brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* *267*, 5421-5426.

O'brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* *267*, 5421-5426.

Oliveira, G. (2015). Determination in vitro of the antioxidant capacity of natural products by the DPPH• method: review study. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, *17*(1), 36-44.

Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(1), 3-11.

Rivera, S. M., Christou, P., & Canela-Garayoa, R. (2014). Identification of carotenoids using mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, *33*(5), 353-372.

Rodrigues, D. B., Flores, É. M., Barin, J. S., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2014). Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, *65*, 144-148.

Rufino, M. D. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., de Morais, S. M., Sampaio, C. D. G., Pérez-Jimenez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>o+</sup>. *Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.

Saha, N., Samanta, A. K., Chaudhuri, S., & Dutta, D. (2015). Characterization and antioxidant potential of a carotenoid from a newly isolated yeast. *Food Science and Biotechnology*, *24*(1), 117-124.

Sampaio, C. P. L., Dias, I. M., Faria, F. M., & Oliveira, M. V. M. (2013). Principais bactérias causadoras de infecção hospitalar. *Rev Dig Buenos Aires*, *10*, 182.

Santos, T. L. D., Queiroz, R. F., Sawaya, A. C., Lopez, B. G. C., Soares, M. B., Bezerra, D. P., ... & Waldschmidt, A. (2017). Melipona mondury produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(3), 2247-2259.

Sena, A. R. D., Júnior, V., Lima, G., & Assis, S. A. (2012). Application of Doehlert experimental design in the optimization of experimental variables for the *Pseudozyma* sp.(CCMB 306) and *Pseudozyma* sp.(CCMB 300) cell lysis. *Food Science and Technology*, 32(4), 761-767.

Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 7(10), 528-539.

Sharmila, G., Nidhi, B., & Muthukumar, C. (2013). Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder. *Industrial crops and products*, 44, 158-164.

Singleton, V.L. Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, v.299, p. 152-178.

Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., & Yamada, M. (2016). Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 7, 181-186.

Suffness, M., Pezzuto, J.M., 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. Editor. *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. London: Academic Press. 71–133.

Suraiya, S., Siddique, M. P., Lee, J. M., Kim, E. Y., Kim, J. M., & Kong, I. S. (2018). Enhancement and characterization of natural pigments produced by *Monascus* spp. using *Saccharina japonica* as fermentation substrate. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 729-742.

Torres, F. A. E., Zaccarim, B. R., de Lencastre Novaes, L. C., Jozala, A. F., Dos Santos, C. A., Teixeira, M. F. S., & Santos-Ebinuma, V. C. (2016). Natural colorants from filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(6), 2511-2521.

Venkatachalam, M., Zelena, M., Cacciola, F., Ceslova, L., Girard-Valenciennes, E., Clerc, P., ... & Giuffrida, D. (2018). Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. *Journal of Food Composition and Analysis*.

Yolmeh, M., & Khomeiri, M. (2017). Effect of mutagenesis treatment on antimicrobial and antioxidant activities of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis*. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 10, 285-290.

Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Pigmentos de origem natural obtidos de microrganismos vêm sendo bastante estudados como opção segura para substituir os pigmentos sintetizados quimicamente. Além disso, os fungos são fontes de pigmentos prontamente disponíveis. O presente estudo indicou as vantagens da aplicação de um planejamento de mistura para extração dos pigmentos naturais.