

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

KAMILA RODRIGUES SILVA

**INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO POR
*TALAROMYCES MINIOLUTEUS***

PATOS DE MINAS

AGOSTO DE 2017

KAMILA RODRIGUES SILVA

**INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO POR
*TALAROMYCES MINIOLUTEUS***

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Patos de Minas, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador (a): Profa. Dra. Liliane Maciel de Oliveira

PATOS DE MINAS

AGOSTO DE 2017

KAMILA RODRIGUES SILVA

**INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO POR
*TALAROMYCES MINIOLUTEUS***

Monografia aprovada para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Patos de Minas (MG) pela banca examinadora constituída por:

Patos de Minas, 02 de agosto de 2017

Liliane Maciel de Oliveira

Profa. Dra. Liliane Maciel de Oliveira – UFU/MG

Carla Zanella Guidini

Profa. Dra. Carla Zanella Guidini– UFU/MG

Líbia Diniz Santos

Profa. Dra. Líbia Diniz Santos– UFU/MG

AGRADECIMENTOS

A Deus pela grandiosa oportunidade de poder estar finalizando esta etapa e por sua iluminação divina em cada amanhecer

Aos meus mentores espirituais que estão sempre ao meu lado

A minha vida

Aos meus pais Cleonice e Carlos, por serem a minha maior inspiração na vida, pelo carinho, amor e respeito

Aos meus irmãos Angélica, Luiz Carlos, Cássio e Michele, pela dedicação e incentivos

Aos meus amigos PKMs que mesmo pela distância estiveram presentes

As minhas eternas amigas Ana Monaliza e Yulaine por todos esses anos com suas verdadeiras amizades

A minha orientadora Profa. Dra. Liliane Maciel de Oliveira por proporcionar essa oportunidade com tanta paciência e dedicação

A Profa. Dra. Líbia por ter fornecido parte do material utilizado no trabalho

Aos membros da banca, Profa. Dra. Carla Zanella Guidinni e Profa. Dra. Líbia, por aceitarem o convite de participar e contribuir com seus conhecimentos para aprimoramento do trabalho

As técnicas do laboratório de Engenharia de Alimentos Betânia, Laís e Istefane por todo auxílio e atenção para com os experimentos realizados

A Professora Vicelma Cardoso e ao aluno Felipe Moreira, ambos da FEQ, por terem realizado as análises para determinação do glicerol por cromatografia líquida no equipamento do NUCBIO

RESUMO

A cor é um dos atributos fundamentais observados pelo consumidor no momento da compra de um produto. Por esta razão, diversos setores industriais, dentre eles os setores alimentícios, têxteis, cosméticos e de fármacos começaram a investir em compostos que conferem cor para tornar seus produtos mais atrativos. Pigmentos são substâncias que podem ser utilizadas para realçar e ou conferir cor a um produto. Nas indústrias de alimentos os corantes são muito utilizados principalmente em alimentos processados. Esses aditivos que conferem cor podem ser obtidos de fontes naturais ou artificiais. Hoje em dia, existe uma maior procura pelos corantes naturais por causarem menos danos à saúde do consumidor em relação aos produzidos sinteticamente. Muitos microrganismos são capazes de produzir pigmentos naturais de diferentes tons de cor, sendo que os fungos se destacam neste tipo de produção. Assim, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar diferentes fontes de carbono na produção de pigmento vermelho por *Talaromyces minioluteus* em cultivos submersos. Os substratos estudados foram a glicose, a maltose, o glicerol e o amido. Foram realizados cultivos em quatro meios de cultura diferentes, sendo que três deles diferiam-se apenas pela fonte de carbono: A1RDP1, contendo amido, G2 contendo glicerol e G3 contendo glicose. O quarto meio avaliado foi o meio ISP2, contendo glicose e maltose. O meio ISP2 é um meio já descrito na literatura para produção do pigmento por *T. minioluteus* e foi usado como o padrão de comparação deste estudo. A análise dos dados dos cultivos mostrou que a maior concentração celular, de 6,04 g/L, foi obtida no meio ISP2 (contendo glicose e maltose) com velocidade específica de crescimento de 0,069 h⁻¹. Observou-se que o fungo teve maiores concentrações de biomassa nos cultivos com a presença de glicose em suas composições. A produção de pigmento foi maior no meio G2 (contendo glicerol), de 5,23 UA/L, com fator de conversão de substrato em produto de 2,15 UA/g. Notou-se o início da produção de pigmento após a fase de crescimento microbiano, comprovando que o mesmo possui a característica de metabólito secundário. A redução do pH e/ou uma possível repressão pela alta concentração de glicose pode ter interferido na produção de pigmento por *T. minioluteus* no meio G3.

Palavras-chaves: Pigmentos naturais, *Talaromyces minioluteus*, cultivo submerso, fontes de carbono, metabólito secundário.

ABSTRACT

Color is one of the fundamental attributes observed by consumers when purchasing a product. For this reason, several industrial sectors, including food, textiles, cosmetics and pharmaceuticals have begun to invest on compounds that give color and make their products more attractive. Pigments are substances that can be used to enhance and / or give color to a product. In the food industries dyes are widely used in processed foods. These color-conferring additives may be obtained from natural or artificial sources. Nowadays, there is a greater demand for natural dyes because they cause less damage to human health when compared to synthetic colorants. Many microorganisms are able to produce natural pigments of different shades of color, and fungi are having greater prominence for this production. Thus, the main objective of this study was to evaluate different carbon sources in the production of a red pigment by *Talaromyces minioluteus* in submerged fermentations. The substrates studied were glucose, maltose, glycerol and starch. Fermentations were carried out using four culture media, and in three of them only the carbon source was different: A1RDP1, containing starch, G2 containing glycerol and G3 containing glucose. The fourth medium evaluated was ISP2, containing maltose and glucose. ISP2 is a culture medium described in the literature for production of pigment by *T. minioluteus* and it was used in this study for comparison with the other media evaluated. The results showed that the highest cell concentration, of 6.04 g/L, was obtained in the ISP2 medium with a maximum specific velocity of 0.069 h⁻¹. It was observed that the fungus achieved higher biomass concentrations in fermentations containing glucose. Pigment production was higher in G2 medium, 5.23 AU/L, with substrate conversion factor in product of 2.15 AU/g. It was observed the beginning of pigment production at the end of microbial growth phase, behavior characteristic of secondary metabolite. The reduction in pH and/or a possible repression by the high concentration of glucose may have interfered in the production of pigment by *T. minioluteus* in G3 medium.

Key words: Natural pigments, *Talaromyces minioluteus*, submerged cultivation, carbon sources, secondary metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mercado de corantes no Brasil em 2007.....	11
Figura 2 - Inseto <i>Dactylopius coccus</i> (Cochonilha)	14
Figura 3 - Frascos com os quatro meios de cultivos na fase inicial do processo fermentativo, para os meios G2 (glicerol), ISP2 (glicose e maltose), A1RDP1 (amido) e G2 (glicose).	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Corantes permitidos e suas respectivas faixas de coloração	10
Tabela 2 - Corantes sintéticos e seus efeitos adversos	12
Tabela 3 - Alguns pigmentos produzidos por via microbiana.....	15
Tabela 4 - Valores de velocidade específica de crescimento, coeficientes de rendimento e produtividade máxima. ISP2 (glicose e maltose), A1RD1(amido), G2 (glicerol) G3 (glicose).	34

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	7
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1.	Pigmentos.....	9
2.1.1.	Pigmentos artificiais	11
2.1.2.	Pigmentos naturais	13
3.1.3	Pigmentos produzidos por microrganismos	15
3.2	Regulação da produção de metabólitos secundários	18
3.3	Influência das fontes de carbono na produção de pigmentos	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1.	Microrganismo	24
4.2	Meios de cultura.....	24
4.1.1	Meio de cultura para reativação dos esporos preservados nos criotubos	24
4.1.2	Meio de cultura utilizados nos ensaios de produção.....	24
4.2	Procedimento Experimental	25
4.2.1	Cultivos em mesa incubadora rotativa	25
4.3	Metodologia analítica	26
4.3.1	Determinação da concentração de glicose e amido.....	26
4.3.2	Determinação da concentração de glicerol.....	26
4.3.3	Determinação da concentração celular.....	27
4.3.4	Determinação da concentração de pigmento.....	27
4.3.5	Cálculo dos parâmetros cinéticos	27
4.3.5.1	Velocidade específica de crescimento.....	27
4.3.5.2	Produtividade máxima de produção de pigmentos	29
4.3.5.3	Coeficientes de rendimento	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1.	Influência das fontes de carbono no crescimento celular e na produção de pigmento.....	32
5.	CONCLUSÃO	39
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

Pigmentos são substâncias que conferem cor e são muito utilizadas em indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticas, têxtil, entre outras. Podem ser extraídos de fontes vegetais, animais, minerais ou serem produzidas sinteticamente. Atualmente os consumidores têm uma visão negativa sobre o uso de produtos artificiais, buscando alternativas naturais e saudáveis para a alimentação. Observando esta tendência, as indústrias alimentícias procuram novos insumos, meios e tecnologias para não perder credibilidade no mercado e nem reduzir seu lucro. Uma das possibilidades é a utilização de corantes naturais em substituição aos artificiais.

Os pigmentos de fontes naturais podem ser extraídos de plantas, insetos e microrganismos. Eles têm sido destaque comercialmente por causarem menos danos à saúde do consumidor e por estarem envolvidos com importantes atividades biológicas. Segundo Volpe, Renhe e Stringueta (2009), esses compostos possuem propriedades antioxidantes, que conferem proteção contra danos oxidativos a componentes celulares, efeitos anti-inflamatórios e também podem prevenir doenças crônicas.

Muitos microrganismos produzem metabólitos que podem ser aproveitados comercialmente, como por exemplo a produção de isopestacina (antioxidante) por *Pestalotiopsis microspora* e iludano (antifúngico) por *Agrocybe agerita* (CARVALHO; ABRAHAM; MACEDO, 2008). Os fungos têm sido muito estudados por serem grandes produtores de diferentes compostos de interesse industrial, tais como: vitaminas, antibióticos, esteroides, pigmentos, enzimas, ácidos orgânicos e aminoácidos (CHAKRABORTY; GHOSH; CHAKRABORTY, 2010). Pigmentos produzidos por fungos vêm sendo estudados por possuírem maior estabilidade em relação aos pigmentos naturais de origem animal e vegetal. Como exemplos podem ser citados aqueles produzidos por cepas de *Aspergillus nidulans* que produzem aditivos de cor marrom (PRETTI, 2009), fungos *Penicillium sclerotiorum* com a produção de corantes alaranjados (GOMES, 2011), *Talaromyces minioluteus* produzindo pigmentos de coloração vermelha (ROMANO, 2015). *Monascus* produzem pigmentos de cores amarela, laranja e vermelho, sendo que o vermelho é mais utilizado comercialmente. Esses corantes já são utilizados em alguns países do oriente (DUFOSSÉ, 2006).

A produção de pigmento de cor vermelha por *Talaromyces minioluteus* está chamando a atenção de alguns pesquisadores para estudos em fermentação submersa. Entretanto, ainda existem poucos estudos relatados na literatura sobre este fungo. De acordo com Yilmaz et al. (2014) o fungo *T. minioluteus* origina-se da Espanha e pode ser encontrado em frutas danificadas. Romano (2015)

descobriu que este pigmento não apresentava atividade tóxica contra alguns tipos de células humanas. Ferreira et. al. (2015) estudaram a cinética de produção do pigmento em meio ISP2. Na literatura, há apenas estes dois trabalhos estudando a produção de pigmento vermelho por este microrganismo.

Para Kumar et al. (2015), os microrganismos ideais para produção de pigmentos são aqueles que conseguem utilizar diferentes fontes de carbono e nitrogênio, são tolerantes a diferentes condições de pH, presença de minerais e temperaturas, para se ter assim um bom rendimento de produção dos metabólitos desejados. Entre os nutrientes, o efeito da fonte de carbono na produção de metabólitos secundários tem sido objeto de estudo contínuo tanto por parte da indústria como nos grupos de pesquisa, não apenas da fermentação, mas também do ponto de vista bioquímico e biológico-molecular (RUIZ et al, 2010). A glicose é uma das principais fontes de carbono utilizadas para se cultivar microrganismos, mas também outras fontes, como glicerol, amido e sacarose podem ser estudadas como alternativas de melhorar e viabilizar a produção dos pigmentos naturais.

A utilização de pigmentos naturais em alimentos aumentou significativamente por causarem menos efeitos nocivos para o consumidor em relação aos corantes artificiais. Diante disso, vários estudos têm sido conduzidos para descobrir novas formas de obtenção desses corantes, como por exemplo, os pigmentos produzidos por microrganismos. As condições de cultivo do microrganismo influenciam diretamente no crescimento microbiano e na produção desses pigmentos, sendo importante o controle desses aspectos. Dentre esses fatores, a fonte de carbono é um dos elementos principais para o desenvolvimento dos microrganismos. Assim, este trabalho teve como objetivo geral avaliar diferentes fontes de carbono no cultivo do fungo *Talaromyces minioluteus* para determinação do nutriente mais eficaz na produção de pigmento vermelho, visando se futuramente esse fungo pode ser empregado como um produtor industrial. Para alcançar a consecução do objetivo acima, procurou-se alcançar os seguintes objetivos específicos:

- 1 Realizar os cultivos submersos variando a fonte de carbono empregada no meio de cultivo;
- 2 Determinar os parâmetros cinéticos de crescimento e produção;
- 3 Analisar e relacionar os parâmetros cinéticos com a produção de pigmento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Pigmentos

A cor e a aparência são uns dos principais fatores a serem avaliados pelos consumidores no momento da obtenção dos produtos alimentícios (FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010), proporcionando efeitos atrativos ou inibitórios no momento da aquisição (ROCHA; REED, 2014). Para o consumidor, a percepção das cores, aroma e textura na maioria das vezes sobressai ao valor nutricional de um determinado produto (CONSTANT; STRINGUETA; SANDI, 2002). Pigmentos são compostos que atribuem cor aos produtos, tornando-os agradáveis para a avaliação dos consumidores (DUFOSSÉ *et al.*, 2005).

A Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997, regulamentada pelo Ministério da Saúde e a Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS/MS 540/97), define aditivo alimentar como:

É qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Isto implicará direta ou indiretamente fazer com que o próprio aditivo ou seus produtos se tornem componentes do alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais.

Diante disso, corantes são considerados aditivos alimentares. Segundo a Resolução nº 44 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) descrita em 1977, corantes são substâncias (isoladas ou misturas em pó) que têm a capacidade de conferir ou intensificar a coloração de alimentos e bebidas. São excluídos desta definição sucos ou extratos de vegetais por terem cor própria, exceto se inserido no produto para realçar ou atribuir cor. A quantidade máxima de aditivos e corantes a serem utilizados e em quais alimentos podem ser adicionados são regulamentados pela Resolução nº 04, de 1988, do Conselho Nacional da Saúde (BRASIL, 1997).

Todos os corantes devem ser isolados por procedimentos tecnológicos adequados para o uso em alimentos. Os mesmos são classificados em corante orgânico natural, extraído de vegetais ou animais; corante orgânico sintético proveniente de síntese orgânica, sendo que dentro desta

classificação há a subclasse do corante artificial, aquele que não é encontrado em produtos naturais, e do corante idêntico ao natural cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural; o corante inorgânico obtido a partir de substâncias minerais que devem passar por etapas de purificação; e o corante caramelo resultado do aquecimento de açúcares a temperatura que ultrapasse seu ponto de fusão (BRASIL, 1977). A Tabela 1 apresenta os corantes naturais e artificiais permitidos pela legislação brasileira.

Tabela 1 - Corantes permitidos e suas respectivas faixas de coloração

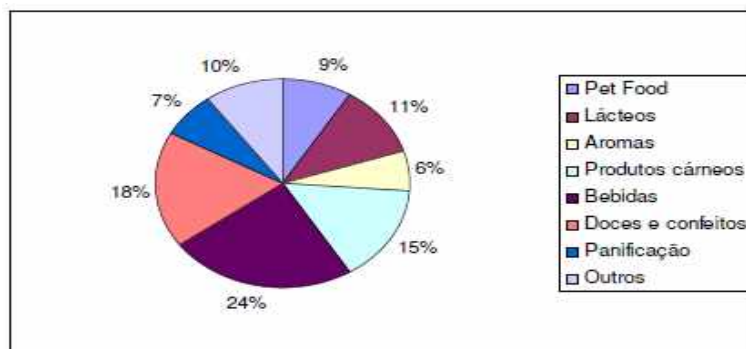
Faixas de coloração	Corantes naturais	Corantes artificiais
Amarelo	Riboflavina, carotenoides (alfa, beta e gama) e xantofilas (flavoxantina, luteína, criptoxantina, rubixantina, etc)	Amarelo crepúsculo, amarelo ácido, amaranço, tartrazina.
Vermelho	Carmin, carotenoides (bixina, capsantina e licopeno), xantofilas (cantaxantina), betanina e antocianinas	Ponceau 4R, vermelho sólido E, vermelho 40, escarlata GN,
Azul	Antocianinas e urzela	Azul brilhante FCF, azul de idantreno RS e indigotina
Rosa	-	Eritrosina
Alaranjado	Curcumina	-
Marrom	Urzela e caramelo	-
Roxo	Antocianinas	-
Verde	Clorofila	-

Fonte: BRASIL, 1978.

Como grande parte dos alimentos processados possui corantes, o mercado destes aditivos tenderá a se ampliar de forma gradativa. Cerca de 4% do Produto Interno Bruto (PIB) e 30% das vendas para o exterior é representado pelas indústrias de produtos alimentícios (MORITZ, 2005). O consumo de pigmentos naturais no Brasil é de aproximadamente 200 toneladas por ano, gerando para o mercado financeiro cerca de R\$ 80 milhões de reais. A Figura 1 apresenta o uso de corantes no Brasil no ano de 2007. O pigmento vermelho é bastante utilizado comercialmente (VENDRUSCOLO, 2009), podendo ser, por exemplo, substitutos de sais de cura utilizados em

produtos cárneos e também em diferentes indústrias alimentícias (PACIFICO; FERREIRA; KILIKIAN, 2005).

Figura 1 - Mercado de corantes no Brasil em 2007.



Fonte: MEINICKE, 2008.

Dados de pesquisa levantados pela Fashion Network (<http://br.fashionnetwork.com/>) afirmam que em 2015 a rentabilidade anual do mercado de corantes naturais no mundo chegou a aproximadamente 2,9 bilhões de dólares, sendo que desse valor 100 milhões de dólares são provenientes das exportações peruanas (LITMAN, 2016). Segundo o Jornal do Brasil (JB (<http://www.jb.com.br/>), o urucum é o corante natural mais produzido pelas indústrias do mundo. O Brasil é o maior produtor desse corante, cerca de 57% da produção mundial estimada entre 10.000 a 12.000 t, seguido do Peru com 31% (6.000 t), Costa do Marfim e Gana (5.000 t), Quênia (2.000 t), Guatemala (1.500 t), República Dominicana (900 t), Bolívia (500 t), Equador (400 t), Índia (300 t) e México (200 t) (JORNAL DO BRASIL, 2015). No Brasil, existem diversos recursos que podem ser utilizados para a produção de aditivos alimentares que conferem cor, principalmente na obtenção dos corantes de origem natural, pela grande variedade biológica do país (MEINICKE, 2008).

2.1.1. Pigmentos artificiais

Segundo Netto (2009), em 1856 Willian Henry Perkin produziu o primeiro corante sintético e o nomeou de malva (malvina). Friedrich Engelhorn criou em 1865 a BASF (Badische Anilin - & Soda- Fabrik A G) para fabricar pigmentos do alcatrão da hulha. Devido ao desenvolvimento de novas tecnologias começaram a surgir indústrias produtoras de pigmento substituindo os corantes naturais.

Os pigmentos sintéticos continuam sendo utilizados em larga escala nas indústrias alimentícias por apresentarem diversos tons de coloração, diferentes composições, terem maior estabilidade à luz, oxigênio, alta temperatura e pH, menores custos e menor susceptibilidade a contaminação microbiana (MORITZ, 2005; SOUZA, 2012).

Entretanto, muitos corantes sintéticos têm sido relacionados a efeitos nocivos à saúde, conforme os dados da Tabela 2. Cerca de 20% da população é alérgica aos compostos pertencentes ao grupo azoico, que são sintetizados a partir do alcatrão do carvão mineral. Em comum, essas pessoas também possuem alergia da aspirina (KUMAR et al., 2015; DUFUSSÉ, 2006). A utilização abusiva destes pigmentos elevou os casos de intoxicação por metais pesados como, por exemplo, o chumbo e o mercúrio (CUNHA, 2008). Esses metais são provenientes do contato do alimento com os utensílios utilizados em sua fabricação (ZENEBO et al., 2004). Por estas razões, observa-se uma mudança de comportamento do consumidor, que está tendo preferência por aditivos alimentares de origem natural (MORITZ, 2005).

Tabela 2 - Corantes sintéticos e seus efeitos adversos

Nome	Obtenção	Aplicação	Efeitos adversos
Amarelo Crepúsculo	Sintetizado a partir da tinta de carvão e tintas azoicas	Cereais, balas, caramelos, coberturas e xaropes, laticínios, gomas de mascar	A tinta azoica, em algumas pessoas, causa alergia, produzindo urticária, angiodema e problemas gástricos
Azul brilhante	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão	Laticínios, balas, cereais, queijos, recheios, gelatinas, licores, refrescos	Pode causar hiperatividade em crianças, eczema e asma. Deve ser evitado por pessoas sensíveis às purinas
Amaranto (Vermelho Bordeaux)	Sintetizado a partir de alcatrão de carvão	Cereais, balas, laticínios, geleias, gelados, recheios, xaropes, preparados líquidos	Deve ser evitado por pessoas sensíveis à aspirina. Este corante já causou polêmica sobre sua toxicidade em animais de laboratório, sendo proibido em vários países
Vermelho eritrosina	Tinta do alcatrão do carvão	Pós para gelatinas, laticínios, refrescos, geleias, etc.	Pode ser fototóxico. Contém 557 mg de iodo por grama de produto. Consumo excessivo pode causar aumento de

Nome	Obtenção	Aplicação	Efeitos adversos
			hormônio tireoidiano no sangue, em níveis para causar hipertireodismo
Indigotina (azul escuro)	Tinta do alcatrão de carvão	Gomas de mascar, iogurtes, balas, caramelos, bebidas, etc.	Pode causar náuseas, vômitos, hipertensão e ocasionalmente alergia, com prurido e problemas respiratórios
Vermelho Ponceau 4R	Tinta do alcatrão de carvão	Frutas em caldas, laticínios, xaropes de bebidas, balas, cereais, refrescos e refrigerantes, sobremesas, etc.	Deve ser evitado por pessoas com sensibilidade à aspirina e asmáticos. Pode causar anemia e aumento da incidência de glomerulonefrite (doença renal)
Vermelho 40	Sintetizado quimicamente	Alimentos à base de cereais, balas, laticínios, recheios, sobremesas, etc.	Pode causar hiperatividade em crianças, eczemas e dificuldades respiratórias

Fonte: Furtado (2007).

2.1.2. Pigmentos naturais

As principais fontes de obtenção dos pigmentos naturais são: plantas, insetos, algas e microrganismos (MENDONÇA, 2011). A procura por alimentos mais saudáveis faz com que os pigmentos naturais tenham maior valor agregado, visto que estes corantes causam menos danos à saúde do consumidor (DUFOSSÉ, 2006).

Os pigmentos naturais eram extraídos desde as civilizações antigas de vegetais como flores, sementes, frutos e cascas, e de animais, insetos e moluscos. Até meados de 1850 as cores laranja eram provenientes de cenoura e açafrão, as pretas de casca de uva e as vermelhas de beterraba e ácido carmínico extraídos de insetos como, por exemplo, a cochonilha (Figura 2) (SOUZA, 2012).

Figura 2 - Inseto *Dactylopius coccus* (Cochonilha)



Fonte: <https://fugadacaverna.wordpress.com/tag/corante-cochonilha/>. Acesso em 30 de junho de 2017.

De acordo com Fujiwara (2016) alguns pigmentos naturais dos alimentos possuem propriedades fisiológicas benéficas que mantêm o equilíbrio do organismo humano. O pigmento betacaroteno, responsável pela coloração alaranjada dos alimentos, auxilia na defesa da pele frente aos raios UV e na produção de melanina. O licopeno, encontrado em alimentos vermelhos como o tomate, além de possuir componentes antioxidantes, ajuda a regular os níveis de colesterol. As antocianinas são encontradas principalmente em beterrabas, tendo uma cor característica de vermelho escuro, e podem auxiliar na redução de câncer de pele, pulmão e do trato gastrointestinal.

Para a obtenção desses corantes é necessário que se tenha a disponibilidade das fontes naturais. O carmim é extraído dos insetos da cochonilha fêmea e para se obter uma produção em torno de 100g de corante é preciso de aproximadamente 14000 insetos. A produção de pigmentos a partir de vegetais necessita de terra disponível para o cultivo do vegetal e está sujeita às condições climáticas (MAPARI et al, 2005). A eficiência dos processos de extração, aplicação e desenvolvimento dos aditivos alimentares naturais dependerá da forma estrutural e das propriedades destes pigmentos. O conhecimento destes fatores impedem perdas, evitam alterações não desejáveis na cor do pigmento e garantem que o alimento processado não perderá a cor original (RIBEIRO; SERAVALI, 2007).

Os corantes naturais provenientes de fontes animal ou vegetal possuem algumas desvantagens que limitam sua utilização durante o processamento, estocagem e aparência quando adicionados ao alimento. As antocianinas são sensíveis à oxidação e a coloração varia com o pH, não podendo ser aplicadas em alimentos e bebidas ácidas. Alguns pigmentos provenientes da clorofila, betaninas e carotenoides perdem a cor quando expostos à luz, calor e oxigênio (MAPARI et al, 2005).

Pigmentos produzidos a partir de vias biotecnológicas são uma opção viável diante dos corantes obtidos de fontes vegetal e animal. Eles apresentam menores problemas de estabilidade, a

oferta não é afetada por mudanças climáticas e o processo produtivo pode ser otimizado em laboratório de modo a obter maior produtividade, seja pelo estudo de diferentes modos de cultivo, meios de cultura e melhoramento genético do microrganismo (MEINICKE, 2008).

3.1.3 Pigmentos produzidos por microrganismos

Pigmentos produzidos a partir de microrganismos, como algas, fungos e bactérias, estão sendo utilizados comercialmente como corantes (LAKSHMI, 2014). Dentre eles, se destacam os carotenoides, as melaninas, as flavinas e as quinonas. A Tabela 3 apresenta os pigmentos que atualmente já estão no mercado e que podem ser utilizados em alimentos ou estão em fase de pesquisa e desenvolvimento.

Tabela 3 - Alguns pigmentos produzidos por via microbiana

Composto	Cor	Microrganismo	Situação*
Ankaflavina	Amarelo	<i>Monascus</i> spp. (fungo)	PI
Astaxantina	Vermelho-rosa	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> / <i>Phaffia rhodozyme</i> (levedura)	ED
Cantaxantina	Vermelho escuro	<i>Bradyrhizobium</i> ssp. (bactéria)	PP
Licopeno	Vermelho	<i>Blakeslea trispora</i> (fungo)	ED
Melanina	Preto	<i>Saccharomyces neoformans</i> var. <i>nigricans</i> (levedura)	PP
Monascorubramina	Vermelho	<i>Monascus</i> spp. (fungo)	PI
Riboflavina	Amarelo	<i>Ashbya gossypi</i> (fungo)	PI
Rubropunctatina	Laranja	<i>Monascus</i> spp. (fungo)	PI
Zeaxantina	Amarelo	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> (bactéria)	PP
β -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Blakeslea trispora</i> (fungo)	PI
Desconhecido	Vermelho	<i>Paecilomyces sinclairii</i> (fungo)	PP

Fonte: Dufossé (2006). *Produção Industrial (PI), estágio de desenvolvimento (ED), projeto de pesquisa (PP).

De acordo com a legislação brasileira que determina os corantes naturais permitidos para uso em alimentos e bebidas, dos corantes apresentados na Tabela 3 apenas a riboflavina e o β -caroteno se enquadram diante da legislação. No entanto, a legislação não especifica a forma de obtenção do corante, visto que há possibilidade de ser a partir de vegetais e/ou por processo biotecnológico.

Os pigmentos produzidos por *Monascus* são comumente utilizados em produtos cárneos, sopas, molhos e bebidas, nos países orientais, especialmente na China, Japão e Ásia. No sudeste Asiático o corante é destinado principalmente para a produção do arroz vermelho fermentado (anka), queijo de soja e para produção de vinho de arroz. Este fungo produz pigmentos de cor amarela (ankaflavina e monascina), alaranjada (rubropunctatina e monascorrubina) e vermelha (rubropunctamina e monascorrubramina). Um inconveniente de se utilizar os pigmentos produzidos por este microrganismo é que algumas cepas de *Monascus* produzem a micotoxina citrinina, um metabólito tóxico, também produzido por alguns gêneros de *Aspergillus* e *Penicillium*. Por esta razão, “os corantes *Monascus*” ainda são proibidos na Europa e nos Estados Unidos (CARVALHO et al., 2006; DUFOSSÉ, 2006; RENHE et al., 2006).

A utilização e produção de pigmentos bacterianos como corantes naturais têm sido muito estudada por diversos autores (VENIL; ZAKARIA; AHMAD; 2013). A violaceína é um pigmento de cor violeta, conhecida por possuir funções biológicas antimicrobianas e antitumorais (MELO et al., 2000). É produzido por diversas bactérias, sendo que a mais conhecida é a *Chromobacterium violaceum* (PITLOVANCIV et al., 2006). Úbeda (2008) estudou a produção de carotenoides a partir da bactéria *Kocuria rhizophila*. O β -caroteno e o licopeno são exemplos de carotenoides que já são comercializados e conhecidos por possuírem função antioxidante (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004). Squina et al. (2002) avaliaram a produção de carotenoides pelas leveduras do gênero *Rhodotorula* em cultivo a base do caldo de cana-de-açúcar, sendo que os principais compostos identificados foram torularrodina, tolueno, γ - caroteno e β -caroteno.

A prodigiosina é um pigmento vermelho produzido por alguns microrganismos como *Serratia* sp, *Streptomyces coelicolor* e *Habella chejuensis* (JEONG, 2005). Lins (2010) isolou cepas de *Serratia marcescens* UCP 1549 para produção e caracterização desse pigmento e testou seu nível de toxicidade em sementes de alface e pimentão. Observou que não houve germinação nas sementes de pimentão, representando alta toxicidade para as mesmas e somente 44,5 % das sementes de alface germinaram. De fato, existem diversas formas de obtenção dos corantes naturais, mas muitos estudos também devem ser feitos para avaliar se esses pigmentos apresentam níveis de toxicidade. Essas pesquisas garantem que os mesmos não serão prejudiciais à saúde do consumidor.

Dentre os microrganismos, os fungos estão atraindo maior interesse por produzirem diversas cores de pigmentos que possuem alta estabilidade química (HAJJAJ et al., 2000). *Trichoderma* são fungos encontrados no solo e possuem espécies produtores de pigmentos que variam do amarelo-esverdeado ao vermelho (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). *Ashbya gossypii* é capaz de produzir a riboflavina (vitamina B2) bastante utilizada como corante em alimentos (DUFOSSÉ, 2006). A xantoepocina é um pigmento de cor amarela com atividade antibiótica sintetizado por fungos, como *Penicillium bialowiezense* EXF-1307 e *Penicillium bialowiezense* EXF-1319 (SONJAK et al., 2006). De acordo com Samson et al. (2011) diversas espécies de *Talaromyces* e *Penicillium* produzem substâncias que podem ser utilizados como corantes. Büchi et al. (1965) afirmam que as espécies de *Talaromyces* produzem geralmente pigmentos de cores amarelos, laranja e vermelhos.

Recentemente, Romano (2015) isolou um fungo endofítico de folha de Jatobá, identificado como *Talaromyces minioluteus*, que produz um pigmento vermelho ainda não identificado. A grande quantidade produzida despertou interesse para estudos de produção do pigmento em fermentação submersa, com o objetivo de avaliar o potencial deste fungo como um produtor em escala industrial. O autor testou a citotoxicidade do pigmento avaliando o percentual de inibição do crescimento de três linhagens de células tumorais e os resultados mostraram que o pigmento produzido não apresentou atividade tóxica.

O fungo *Talaromyces minioluteus* era conhecido como *Penicillium minioluteus*, tendo sido reclassificado recentemente como do gênero *Talaromyces* (YILMAZ et al., 2014). Os autores mencionam que sua origem é de Valladolid, Espanha, e que podem ser encontrados em frutas danificadas por insetos. Romano (2015) e Ferreira et. al. (2015) estudaram a cinética de produção do pigmento desse mesmo microrganismo no meio de cultura ISP2. Os resultados mostraram que a produção do pigmento apresentou características de metabólito secundário, uma vez que se observou a dissociação entre as fases de crescimento celular e de produção do metabólito. Os valores obtidos auxiliaram na caracterização do comportamento de crescimento do fungo diante da forma de cultivo, sendo fundamentais para a discussão do trabalho em questão, por serem os únicos estudos encontrados na literatura sobre a produção de pigmento por *Talaromyces minioluteus*.

Estes pigmentos possuem algumas vantagens em relação aos pigmentos de origem vegetal e animal, como por exemplo, a possibilidade de utilizar substratos de baixos custos ou resíduos industriais, necessitam de pouco espaço para a produção e não dependem das diferenças de condições climáticas (VALDUGA et al., 2009). Os principais fatores que afetam a produção de pigmentos por microrganismos, assim como de qualquer outro produto biotecnológico obtido via processo

fermentativo, são: as diferentes fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio de cultura, condição de pH, temperatura, teor de umidade, quantidade de minerais, modo de condução do processo e taxa de aeração (KUMAR et al., 2015). Estes fatores devem ser estudados para determinar a melhor condição de processo, obtendo a maior produtividade possível. A fonte de carbono, junto com a água, é o principal elemento para o crescimento microbiano e essencial na síntese de todos os compostos orgânicos fundamentais para a viabilidade celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). As fontes de carbono também têm grande influência na produção de metabólitos secundários. Diante disso, antes de revisar estudos sobre as fontes de carbono na produção de pigmentos será feita uma pequena revisão da regulação da produção de metabólitos secundários.

3.2 Regulação da produção de metabólitos secundários

No período de crescimento, os microrganismos garantem energia para sua sobrevivência e multiplicação celular e, concomitantemente, produzem alguns tipos de metabólitos que variam com a espécie do microrganismo, podendo citar como exemplos ácidos orgânicos, etanol, vitaminas e aminoácidos. Esta fase é conhecida como sendo o metabolismo primário microbiano. Durante a fase estacionária de crescimento são produzidos compostos intermediários que não são fundamentais para a vida do microrganismo, mas alguns apresentam aplicações importantes para o homem e são importantes comercialmente. Estes produtos são resultantes do metabolismo secundário dos microrganismos. Dentre os metabólicos secundários podem ser citados antibióticos, pigmentos, toxinas, feromônios, inibidores enzimáticos, agentes imunomoduladores, pesticidas e agentes antitumorais. Observa-se uma maior produção dos metabólitos secundários na fase estacionária, durante a qual o metabolismo secundário é mais ativo. Contudo, estes compostos também podem ser produzidos em menor quantidade na fase de crescimento celular. Existe uma relação entre o metabolismo primário e o secundário de um microrganismo, sendo que alguns metabólitos primários servem como precursores para a síntese de metabólitos secundários. Como por exemplo, pode-se citar o aminoácido ornitina, que é precursor do ácido clavulânico, um β -lactâmico produzido por *Streptomyces clavuligerus*. Assim, os fatores que influenciam na produção do metabolismo primário também podem interferir no metabolismo secundário, ao interferirem na disponibilidade de precursores (DEMAIN, 1998; DEMAIN; DREW, 1977).

A produção de metabólitos secundários pode ser influenciada também por outros fatores, dentre eles, a disponibilidade de compostos indutores, da velocidade do crescimento celular, da regulação por “feedback”, da concentração de ATP e de componentes do meio de cultura. A regulação do metabolismo secundário pode ocorrer por repressão, que impede a expressão dos genes que codificam as enzimas que participam da rota metabólica de biossíntese do produto, ou por inibição enzimática, em que um inibidor atua regulando a atividade de uma enzima que faz parte da rota de biossíntese do metabólito (DEMAIN, 1998; DEMAIN; DREW, 1977).

O metabolismo secundário pode ser estimulado pela presença de compostos indutores, esta ação se equivale ao processo de indução enzimática. Pode-se citar como exemplo o triptofano, um aminoácido que é o precursor e estimulador do alcaloide ergolina produzida por fungos do gênero *Claviceps*. Para a produção de alguns alcaloides deve-se adicionar o triptofano no meio da fermentação, caso contrário tem-se baixa produção destas substâncias (DEMAIN; DREW, 1977). Compostos indutores podem ser utilizados para aumentar a produção de pigmentos. Hajjaj et al. (2012) inocularam *Monascus ruber* em um meio específico composto por glicose no qual adicionou-se diferentes aminoácidos para estudar o comportamento do fungo para melhorar a produção de pigmento e reduzir a produção de citrinina. Dentre os aminoácidos testados, os autores obtiveram a maior produção de pigmento com a glicina (26 UA_{500nm}), histidina (24 UA_{500nm}) e glutamato (17 UA_{500nm}).

Em muitos processos fermentativos observa-se que a produção dos metabólitos secundários, fase denominada de iodifase, é retardada até que se chegue ao final da fase de crescimento, denominada de trofofase. Microrganismos produtores de antibióticos ganham resistência ao seu próprio produto após a fase de crescimento, por isso essa produção tardia evita o próprio suicídio da célula produtora. Estes mecanismos indicam a dissociação do crescimento-produção dos metabólitos secundários, sendo a produção controlada pela velocidade de crescimento. Algumas enzimas que participam da formação de metabólitos secundários, como por exemplo, as sintetases, são reprimidas na trofofase. Notou-se também que a produção dos antibióticos gramicidina e bikaverina ocorria em maiores quantidades quando a velocidade de crescimento celular era mais baixa (DEMAIN; DREW, 1977).

A regulação por feedback geralmente está relacionada a concentração do produto final e pode acontecer por dois modos: repressão ou inibição enzimática. A produção em excesso do próprio produto ou de algum intermediário da rota metabólica, como no caso a virginiamicina, penicilina e o ácido micofenólico, restringem sua própria síntese. O antibiótico cloranfenicol reprime a produção

da arilamina sintetase que é a primeira enzima envolvida na sua produção. A primeira enzima que sintetiza a produção dos alcaloides (aminas responsáveis pelo sabor amargo de muitas plantas) é inibida pela presença da agroclavina e da elymoclavina, que são produtos resultantes da síntese destes compostos (DEMAIN; DREW, 1977).

Durante a fase de crescimento microbiano, além da formação de compostos necessários para a construção de novas células, também é necessário a produção de energia para a sobrevivência celular. Altas concentrações dessa carga energética, que pode ser medida indiretamente pela concentração de ATP, ADP e AMP dentro da célula, podem inibir ou ativar a atividade de certos grupos enzimáticos. A produção de metabólitos secundários também pode ser inibida por determinadas concentrações de fosfato, que é um mineral constituinte da molécula de ATP. Pode-se citar o processo fermentativo da clotetraciclina. A produção desse antibiótico inicia-se no momento em que o fosfato do meio está completamente esgotado. Desta forma, inferiu-se que a elevadas concentrações desse componente aumentam a carga energética da célula e podem inibir a produção de metabólitos secundários (DEMAIN; DREW, 1977). Segundo Witney, Failla e Weinberg (1976) altas concentrações de fosfato reduzem a formação de metabólitos secundários, dentre eles, vancomicina e piocianina.

A maioria dos microrganismos utilizam a glicose como principal fonte de energia, no entanto, altas concentrações deste nutriente podem inibir ou retardar a produção de metabólitos secundários. (KUZHANDAIVELU, et al., 1992; RUIZ et al., 2010). Demain e Drew (1977) afirmaram que alguns carboidratos de rápida metabolização reduziram a produção de alguns antibióticos (neomicina, bacitranina, penicilina e simiocina), pigmentos (violaceína e prodigiosina) e do agente quimioterápico mitomicina. Para alguns metabólitos secundários a biossíntese inicia-se somente após o esgotamento da glicose no meio de cultura. Um exemplo é a actinomicina. No início do processo fermentativo havia a presença de glicose e observou-se uma severa repressão na produção desse antibiótico. Este fenômeno é chamado de regulação catabólica por fonte de carbono. Esta regulação também pode ocorrer por mecanismos de repressão e/ou inibição de enzimática (INOUE et al., 2007).

Inoue et al. (2007) estudaram a repressão por glicose na formação de retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB20 em cultura submersa empregando concentrações da fonte de carbono variando entre 10 e 25g/L. Os autores observaram que a taxa específica de produção de retamicina (qRTM) utilizando 10g/L de glicose foi cerca de 7,8 mg/g.h. Essa taxa diminuiu para 3,7 mg/g.h com aumento da concentração de glicose para 15 g/L, e que a 20 e 25 g /L de glicose, qRTM foi de aproximadamente 2,5 mg / g.h.

As pesquisas conduzidas por Gutiérrez et al. (1999) mostraram que a glicose reprime a expressão dos genes da penicilina (pcbAB, pcbC e penDE) em *Penicillium chrysogenum* no meio contendo glicose e lactose como substratos. Os autores avaliaram a adição de glicose antes e durante a fermentação. Para tanto, observaram que com a adição de glicose no início da fermentação (0 horas) houve repressão da transcrição dos genes. Observaram que a repressão diminuía ao adicionar a glicose no meio de cultura com a fermentação já em andamento, sendo que adicionando em 12 horas de fermentação, a repressão da expressão dos genes foi maior do que quando adicionada em 24 ou 48 horas.

Fontes de nitrogênio rapidamente metabolizáveis, como a amônia, também podem reprimir o metabolismo secundário (DEMAIN; DREW, 1977). Leбриhi et al. (1992) observaram que a valina desidrogenase, enzima que faz parte do catabolismo de valina, leucina e isoleucina, teve inibição com aumento da concentração da amônia no meio de cultura.

3.3 Influência das fontes de carbono na produção de pigmentos

A produção de pigmentos pode ser influenciada por fatores externos, como temperatura e pH, e também pelos nutrientes existentes no meio (PURWADARIA; GUNAWAN; GUNAWAN, 2010). Meios de cultura são fontes nutritivas que garantem a sobrevivência dos microrganismos, influenciam diretamente no crescimento microbiano e, conseqüentemente, na eficiência da produção de pigmentos (RUIZ et al., 2010). Estes elementos estão dispostos em formas e tamanhos diferentes, podendo estar entre carboidratos simples ou complexos, cadeias de aminoácidos, gorduras e compostos orgânicos. Carboidratos são as principais fontes de carbono utilizadas na síntese de muitos metabólitos secundários (SANTOS, 2013). Estes compostos também são necessários para a produção de biomassa e obtenção de energia celular (CHATTERJEE et al., 2009).

Pitlovanciv et al. (2005) estudaram a produção do pigmento violaceína utilizando a bactéria *Chromobacterium violaceum* em meios de cultivos diferentes, um líquido e outro sólido, utilizando a glicose, o glicerol e frutose como fontes de carbono. Observaram que o microrganismo teve maior crescimento celular na presença de glicose e frutose. Entretanto, a produção de pigmentos foi maior utilizando o glicerol como fonte de carbono. Segundo eles, concentrações elevadas de carbono com alto valor energético podem inibir a produção de alguns metabólitos secundários.

Costa e Vendruscolo (2017) estudaram a influência da glicose e da lactose na produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802. Observou-se maior produção de biomassa (7,99 g/L) e de pigmento vermelho, medido em unidade de absorbância a 510 nm (7,36 UA₅₁₀), na presença de glicose. As concentrações mais baixas foram obtidas em lactose, correspondendo a 2,74 g/L de células e 3,08 UA₅₁₀ de pigmento. Este fungo também foi estudado por Sá (2005) em meios contendo glicose em 20 g/L e amido em 3 g/L em cultivo submerso. O autor verificou maiores produções de pigmento medido em unidade de absorbância a 480 nm (4,98 UDO₄₈₀) e biomassa (5,24 g/L) no meio com amido, sendo que os valores determinados para a glicose foram de 2,74 UDO₄₈₀ e 2,4 g/L, respectivamente.

Barbarato (2014) estudou a obtenção de carotenoides utilizando a levedura *Rhodotorula sp* em melaço nas concentrações 25, 50, 75%, em caldo de cana-de-açúcar e em meio sintético constituído de glicose. O autor notou maiores crescimento celular no meio sintético, seguido do caldo de cana e das respectivas concentrações de melaço. Obteve na mesma sequência anterior as concentrações de 4,06 µg/mL, 1,08 µg/mL, 1,04 µg/mL, 1,03 µg/mL e 0,82 µg/mL, respectivamente, na produção de carotenoides. Silva (2015) também estudou a produção de carotenoides por linhagens do gênero *Rhodotorula sp* em meios constituídos por glicose e glicerina, ambos a 30 g/L. Observou que todas as linhagens tiveram melhor crescimento e produção dos pigmentos quando utilizaram a glicerina como fonte de carbono. Dentre as linhagens estudadas, *R. aurantiaca* URM 6687 se destacou na produção do pigmento medido em unidade de absorbância a 570nm, que foi aproximadamente 7,5 UA₅₇₀. Essa maior produção foi observada um pouco após 20 horas de cultivo.

Mendonça (2011) avaliou diferentes meios de cultura para produção de corantes por *Streptomyces violaceolatus sp.* variando a fontes de carbono: glicose, frutose, maltose, sacarose, glicerina, fécula de batata e polvilho. Dentre as fontes utilizadas, o autor verificou maior intensidade de coloração roxa nos meios a base de amido, sendo eles fécula de batata (amido de batata) e polvilho doce (amido de mandioca). Constatou-se que a absorbância em 530 nm, para a fécula de batata foi acima de 0,7 UA₅₃₀, seguido do polvilho doce que foi aproximadamente 0,5 UA₅₃₀.

Isolados de *Streptomyces* foram cultivados em meios de cultura contendo sacarose, amido, glicerol e glicose para a produção de antimicrobianos contra isolados de *Enterococcus*. O meio que continha o amido levou a formação de halos de inibição maiores variando entre 20-25 mm em 72 horas de crescimento. Os autores também observaram que na presença de sacarose e amido foram produzidos antibióticos desde o tempo zero de incubação e que a produção dos metabólitos com o glicerol teve início após 48 horas de fermentação. Na presença de glicose houve crescimento celular

mas não se observou produção de antibiótico. Segundo eles, o ocorrido pode ser justificado pelo fato da glicose ser um carboidrato simples e degradado de forma mais rápida, restando pouca disponibilidade de carbono e energia para a produção dos antibióticos (ANTUNES et al., 2013).

Jonsbu, McIntyre e Nielsen (2002) avaliaram a produção do antifúngico nistatina por meio do cultivo de *Streptomyces noursei* em meios contendo glicerol, glicose, frutose, amido, galactose, xilose, maltose, sacarose, lactose e rafinose. O microrganismo foi capaz de crescer nos meios com amido, glicerol, glicose e frutose, com concentrações de biomassa 6,1 g/L, 5 g/L, 4,9 g/L e 4,0 g/L, respectivamente. Nenhum crescimento foi observado nas demais fontes de carbono. A partir dos resultados anteriores, os autores avaliaram a produção de nistatina em cultivos com glicose, frutose, glicerol e mistura de glicose com frutose. A produção do antibiótico foi maior nos meios com frutose e glicerol, em relação ao meio com glicose. Observaram um aumento de 20 vezes na produção de nistatina na cultura com a mistura dos dois carboidratos em relação aos meios anteriormente citados.

Lebrihi, Lefebvre e Pierre Germain (1988) estudaram a produção de cefamicina C em cultivos contendo glicerol e amido como fontes de carbono, utilizando o microrganismo *Streptomyces clavuligerus*. No meio com glicerol observaram maior crescimento celular e menor produção do antibiótico (0,3 mg/h/g. célula) do que o meio com amido (0,59 mg/h/ g. célula), cerca de 40% a menos da produção do metabólito.

Portanto, existem diferentes possibilidades para melhorar a produção de pigmentos microbianos, como por exemplo, o estudo de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para auxiliar no rendimento do processo, na formação de biomassa e também na produção dos metabólitos de interesse (MAPARI et al., 2010). E como qualquer outro produto biotecnológico, a produção e produtividade do pigmento sofre influência direta da composição do meio de cultura, principalmente dos tipos e concentrações das fontes de carbono e nitrogênio empregadas. Os estudos apresentados na revisão mostram as maneiras de como as fontes de carbono podem influenciar na produção de metabólitos secundários, sendo que esta influência é diferente para cada tipo de microrganismo e para cada tipo de produto. Por isso, faz-se necessário estudos dessas fontes nutricionais para cada metabólito em particular. Assim, pretendeu-se neste estudo avaliar como a fonte de carbono pode influenciar a produção do pigmento vermelho por *Talaromyces minioluteus*, determinando a melhor fonte para a produção desse metabólito.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo *Talaromyces minioluteus*, mantido em criotubos na forma de esporos (10^7 esporos/mL) a -20°C no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas.

4.2 Meios de cultura

4.1.1 Meio de cultura para reativação dos esporos preservados nos criotubos

A reativação dos esporos foi feita com o meio ISP2, descrito no tópico 4.1.2 a seguir.

4.1.2 Meio de cultura utilizados nos ensaios de produção

Para o estudo proposto, foram avaliados quatro meios de cultura descritos na literatura, sendo que em cada ensaio, o meio de inóculo foi igual ao meio de produção. A composição dos meios é especificada a seguir:

Meio 1- ISP2 (FERREIRA et al., 2015):

- | | |
|-----------------------|----------|
| • Glicose | 4,0 g/L |
| • Extrato de malte | 10,0 g/L |
| • Extrato de levedura | 4,0 g/L |
| • pH | 5,0 |

Meio 2- A1RDP1 OLIVEIRA et al., 2015):

- | | |
|-----------------------|----------|
| • Amido | 10,0 g/L |
| • Extrato de levedura | 4,0 g/L |

- Peptona 2,0 g/L
- pH 5,0

Meio 3- A1RDP1 modificado com glicerol (G2):

- Glicerol 11,4 g/L
- Extrato de levedura 4,0 g/L
- Peptona 2,0 g/L
- pH 5,0

Meio 4- A1RDP1 modificado com glicose (G3):

- Glicose 20,0 g/L
- Extrato de levedura 4,0 g/L
- Peptona 2,0 g/L
- pH 5,0

O pH de cada meio foi ajustado utilizando solução de HCl 1 M.

4.2 Procedimento Experimental

4.2.1 Cultivos em mesa incubadora rotativa

O procedimento experimental foi executado em três etapas: reativação dos fungos esporulados, preparo do inóculo e produção. Todas as etapas foram conduzidas em mesa incubadora rotativa a 28°C e 200 RPM. Na reativação, 1 mL da suspensão de esporos dos criotubos (concentração de 10^7 esporos/mL) foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL do meio de reativação, que foi então incubado por 24 horas. Após este período, 2,5 mL do caldo reativado foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL do meio de inóculo, que foram também incubados por 24h. Terminada esta etapa, 2,5 mL do inóculo foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL do meio de produção, que foram incubados por 72 horas. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo periódicos para determinação da concentração celular, das concentrações de pigmento e do substrato limitante.

4.3 Metodologia analítica

4.3.1 Determinação da concentração de glicose e amido

As concentrações de glicose e amido foram quantificadas por meio de análise de açúcares redutores totais (ART) pela metodologia do ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme a metodologia proposta por Miller et al. (1959). As amostras de amido passaram por hidrólise prévia antes da determinação da análise de ART.

Para a hidrólise, adicionou-se ao tubo de ensaio 1,5 mL de amostra e 1,5 mL de HCl 10 M, que foi posteriormente colocados em banho-maria por 30 minutos a 100°C. Após o resfriamento dos tubos em banho de gelo, foram adicionadas 1,5 mL de solução básica NaOH 5 M.

As amostras de glicose e amido hidrolisado foram diluídas com água destilada, quando necessário, para a determinação dos ART. Adicionaram-se aos tubos de ensaio 0,5 mL de amostra, 1,0 mL da solução de DNS, e posteriormente, os tubos foram mantidos em banho-maria a 100°C durante o tempo de 5 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 11 mL de água destilada aos tubos. As amostras foram homogeneizadas e foi feita a medida da absorbância em espectrofotômetro visível EVEN Modelo IL - 226 no comprimento de onda 540nm.

Para determinar a concentração de amido na amostra multiplicou-se a concentração de ART obtida por 0,9 que é um fator de conversão da glicose em amido.

4.3.2 Determinação da concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no cromatógrafo da marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, utilizando a coluna SUPELCOGEL C-610H e detector de índice de refração. Empregou-se como fase móvel ácido fosfórico (0,1%), com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32°C e volume de injeção de 20 µL.

4.3.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada pelo método de massa seca. 20 mL do caldo de cultivo foram centrifugados a 4°C e 12.000 rpm por 15 min. Posteriormente, foi separado o sobrenadante e iniciou-se a lavagem das células. Adicionou-se 35 mL de água destilada ao tubo de centrífuga, que foi agitado para ressuspender as células e em seguida foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e realizou-se uma nova lavagem. O adensado de células resultante foi transferido para cadinhos de alumínio previamente pesados e determinou-se a massa de células após secagem na estufa a 105°C até massa constante.

4.3.4 Determinação da concentração de pigmento

O pigmento vermelho foi quantificado indiretamente pela medida de absorvância das amostras no comprimento de onda 500nm em espectrofotômetro visível EVEN Modelo IL - 226. Quando necessário, as amostras foram diluídas de maneira que a absorvância máxima medida fosse de 0,500. Como o pigmento ainda não foi identificado, não existe disponível uma curva de calibração relacionando a massa e a absorvância. Logo, os resultados de concentração do produto foram expressos em unidade de absorvância (UA).

4.3.5 Cálculo dos parâmetros cinéticos

4.3.5.1 Velocidade específica de crescimento celular

Segundo Badino e Cruz (2012) para cultivo de processos fermentativos em batelada, aplica-se o balanço geral de acordo com a Equação (1):

$$\begin{aligned} \left(\begin{array}{c} \text{saída de massa} \\ \text{pela fronteira} \\ \text{do sistema} \end{array} \right) &= \left(\begin{array}{c} \text{entrada de massa} \\ \text{pela fronteira} \\ \text{do sistema} \end{array} \right) + \left(\begin{array}{c} \text{geração de massa} \\ \text{no interior} \\ \text{do sistema} \end{array} \right) \\ &\quad - \left(\begin{array}{c} \text{consumo} \\ \text{de massa no interior} \\ \text{do sistema} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{acúmulo} \\ \text{de massa} \\ \text{no sistema} \end{array} \right) \end{aligned} \quad (1)$$

Fazendo o balanço de massa para as células:

$$0 = 0 + r_x \cdot V - r_d \cdot V - \frac{dm_x}{dt}$$

$$0 = 0 + \mu \cdot C_x \cdot V - k_d \cdot C_x \cdot V - \frac{dm_x}{dt}$$

Em que r_x é a velocidade de crescimento celular, V é o volume do reator, r_d é a velocidade de morte celular, m_x é a massa de células no reator e μ é a velocidade específica de crescimento celular.

Sendo $m_x = C_x \cdot V$ e, como nos cultivos em batelada, o volume do caldo é constante (V contante), rearranjando a equação anterior, tem-se a Equação (2) da seguinte maneira:

$$\frac{dC_x}{dt} = (\mu - k_d) \cdot C_x \quad (2)$$

Na fase de crescimento exponencial as concentrações de nutrientes presentes no meio de cultura são altas e a velocidade específica de crescimento celular é máxima ($\mu = \mu_{\max} = \text{constante}$).

Desprezando-se a ocorrência de morte celular ($r_d = 0$), tem-se a Equação (3) a seguir:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{\max} \cdot C_x \quad (3)$$

Integrando a Equação 3, considerando que para $t = t_0 = 0$, $C_x = C_{x_0}$, chega-se na Equação (4), mostrada a seguir:

$$\ln \frac{C_x}{C_{x_0}} = \mu_{\max} \cdot t \quad (4)$$

Sendo:

C_x : concentração celular ao longo da fase exponencial (g.L^{-1});

C_{x_0} : concentração celular no início da fase exponencial (g.L^{-1});

$\mu_{\max}$: velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

t : tempo (h).

De acordo com a equação (4), o valor de $\mu_{\max}$ corresponde ao coeficiente angular da curva de $\ln (C_x/C_{x_0})$ em função do tempo. Estas curvas foram construídas para cada cultivo deste trabalho e foi determinado o coeficiente angular da parte linear das curvas para estimativa do $\mu_{\max}$. As faixas de tempo utilizadas nos cálculos de $\mu_{\max}$ para cada meio foram as seguintes: ISP2 (8 a 24 horas), A1RDP1 (0 a 28 horas), G2 (8 a 40 horas) e G3 (0 a 36 horas).

4.3.5.2 Produtividade máxima de produção de pigmentos

A produtividade máxima de produção de pigmentos foi calculada pela diferença entre a maior concentração de pigmentos (UA) em um instante t e a concentração inicial de pigmentos dividida pelo intervalo de tempo correspondente, conforme Equação 5.

$$P_M = \frac{(UA_{\max t}) - (UA_{t_0})}{t - t_0} \quad (5)$$

Em que:

P_M : produtividade máxima de formação de pigmentos no instante de tempo $(t - t_0)$ (UA.h^{-1});

UA_t : máxima quantidade de pigmento no instante de tempo t ;

UA_{t_0} : quantidade de pigmento no tempo t_0 ;

t : tempo para atingir o valor máximo de UA;

t_0 : tempo inicial do cultivo.

4.3.5.3 Coeficientes de rendimento

De acordo com Badino e Cruz (2012) a velocidade de crescimento celular (r_x), de consumo de substrato (r_s) e velocidade de formação do produto (r_p) são definidas pelas Equações 6, 7 e 8 ilustradas a seguir:

$$r_x = \mu C_x \quad (6)$$

$$r_s = \mu C_s \quad (7)$$

$$r_p = \mu C_p \quad (8)$$

Os coeficientes de rendimento são definidos com base no consumo de uma substância para a formação de outra. Por meio de rearranjos das equações acima, o coeficiente de rendimento de substrato em células e o coeficiente de rendimento de substrato em produto são ilustrados nas Equações 9 e 10 a seguir:

$$Y_{X/S} = \frac{r_x}{r_s} = \frac{\Delta C_X}{-\Delta C_S} \quad (9)$$

Sendo:

$Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em biomassa (g.g^{-1});

ΔC_X : aumento da biomassa no intervalo de tempo Δt (g.L^{-1});

ΔC_S : consumo de substrato no intervalo de tempo Δt (g.L^{-1}).

Para cada cultivo, os coeficientes de rendimento de substrato em células foram determinados por meio do coeficiente angular da parte linear do gráfico de ΔC_S em função ΔC_X . As faixas de tempo utilizadas nos cálculos de $Y_{X/S}$ para cada meio foram as seguintes: ISP2 (8 a 24 horas), A1RDP1 (0 a 28 horas) e G3 (0 a 36 horas).

$$Y_{P/S} = \frac{r_p}{r_s} = \frac{\Delta C_p}{-\Delta C_s} \quad (10)$$

Sendo:

$Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto (UA.g⁻¹);

ΔC_P : aumento da concentração de pigmentos no intervalo de tempo Δt (UA);

ΔC_s : consumo de substrato no intervalo de tempo Δt (g.L⁻¹).

Para cada cultivo, os coeficientes de rendimento de substrato em produto foram determinados por meio do coeficiente angular da parte linear do gráfico de ΔC_S em função ΔC_P . As faixas de tempo utilizadas nos cálculos de $Y_{P/S}$ para cada meio foram as seguintes: ISP2 (24 a 56 horas) e G2 (32 a 48 horas).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Influência das fontes de carbono no crescimento celular e na produção de pigmento

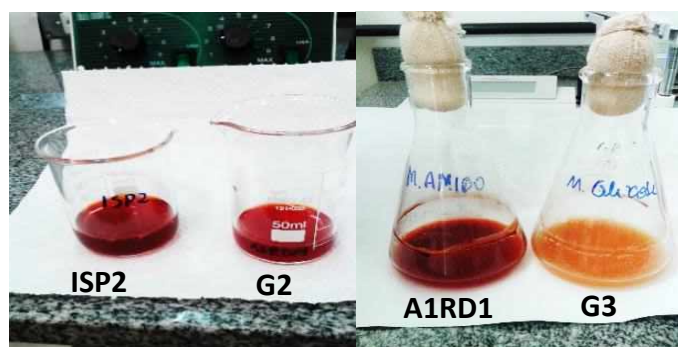
Os meios de cultivo definidos nesta etapa pretenderam aumentar a produção de pigmento pelo fungo *Talaromyces minioluteus*, que foi cultivado em meios contendo glicose, maltose, glicerol e amido como fontes de carbono. As Figuras 3 e 4 apresentam fotos dos frascos com os meios de cultivo na fase inicial e ao final do processo fermentativo. Na Figura 5 estão representadas as curvas crescimento celular, a concentração de substratos, produção de pigmento e pH ao longo do cultivo para cada meio avaliado.

Figura 3 - Frascos com os quatro meios de cultivos na fase inicial do processo fermentativo, para os meios G2 (glicerol), ISP2 (glicose e maltose), A1RDP1 (amido) e G3 (glicose).



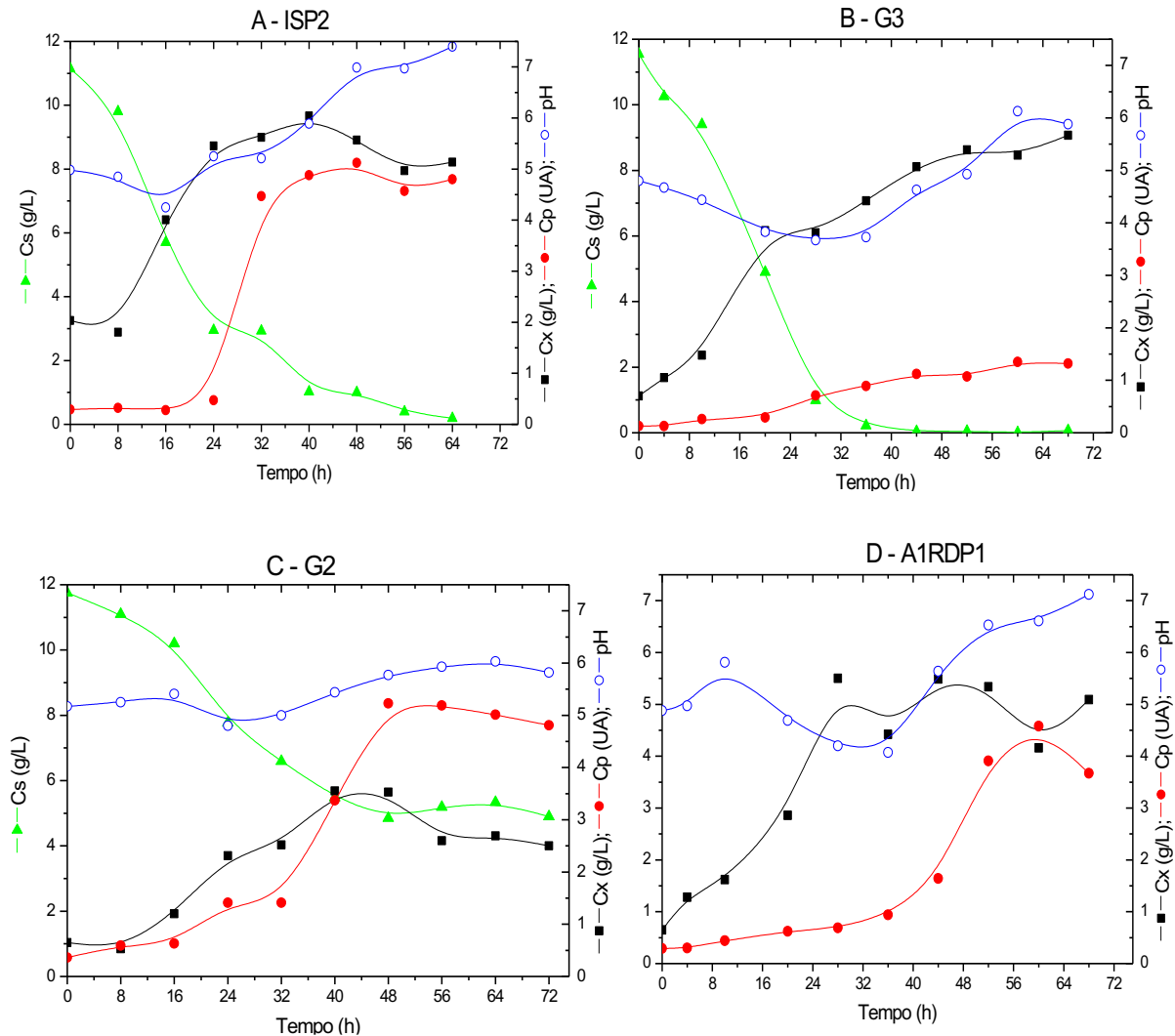
Fonte: Acervo pessoal

Figura 4 - Frascos com os quatro meios de cultivos na fase final do processo fermentativo, para os meios ISP2 (glicose e maltose), G2 (glicerol), A1RDP1 (amido) e G3 (glicose).



Fonte: Acervo pessoal

Figura 5 - Perfis de crescimento celular (Cx), consumo de substrato (Cs), concentração de produto (Cp) e valores de pH para os cultivos com o fungo *Talaromyces maritimus*. A: Cs corresponde à concentração de glicose e maltose; B: Cs corresponde à concentração de glicose; C: Cs corresponde à concentração de glicerol; D: Cs seria a concentração de amido, mas não foi possível determiná-la.



Durante a análise da concentração de substrato do meio A1RD1 houve caramelização da amostra após a hidrólise do amido, impossibilitando a medida de açúcares redutores totais. E como não havia mais amostras para repetir a análise, não foi possível determinar a concentração do substrato neste cultivo.

Para cada cultivo, foram determinados as velocidades de crescimento celular, os coeficientes de rendimento de substrato em células ($Y_{X/S}$) e de substrato em produto ($Y_{P/S}$) (exceto para o meio A1RDP1 pelos motivos explicados acima), e a produtividade máxima de pigmento. Os valores

calculados estão apresentados na Tabela 3, que também mostra a concentração celular máxima e concentração máxima de produto obtidas em cada ensaio, seguido dos tempos de fermentação em que estes valores foram atingidos.

Tabela 4 - Valores de velocidade específica de crescimento, coeficientes de rendimento e produtividade máxima. ISP2 (glicose e maltose), A1RD1(amido), G2 (glicerol) G3 (glicose).

Meio	C _x máx g/L	t _{cx} máx (h)	C _p máx UA/L	t _{cp} máx (h)	μ _{máx} (h ⁻¹)	Y _{x/s} (g _{cel} /g _{sub})	Y _{0 P/S} (UA/g)	Y _{P/S} (UA/g)	P _M (UA/h)
ISP2	6,04	40	5,12	56	0,069 (R ² =0,94)	0,53	0,03	2,02	0,09
A1RD1	5,50	32	4,58	64	0,117 (R ² =0,87)	*	*	*	*
G2	3,55	40	5,23	48	0,057 (R ² =0,91)	0,49	0,21	2,15	0,10
G3	5,67	72	1,35	64	0,048 (R ² =0,89)	0,34	0,05	*	0,02

*Dados indisponíveis devido à impossibilidade de determinação do amido

A conversão inicial de substrato em produto (Y_{0 P/S}) e a conversão final (Y_{P/S}) foram calculadas para verificar a dissociação crescimento-produção durante o processo fermentativo dos meios de cultivo. Durante a fase exponencial calculou-se Y_{0 P/S}, em que se observou maior velocidade de crescimento celular e menor produção de pigmento vermelho. O coeficiente de rendimento Y_{P/S} foi determinado na fase estacionária de crescimento, período no qual se observou redução na velocidade de crescimento celular e maior produção do pigmento vermelho.

Dentre os meios de cultura avaliados, verificou-se que a maior concentração celular foi obtida no meio ISP2 no qual se empregou a glicose e a maltose como fontes de carbono. Neste cultivo a concentração celular atingiu 6,04 g/L em 40 horas de fermentação, resultando em um fator de conversão de substrato em células de Y_{x/s} 0,53 g_{cel}/g_{sub}. Este valor foi o maior entre os demais meios e pode ser devido à presença da glicose, que é um carboidrato de rápida assimilação e que normalmente favorece o crescimento celular (Demain; Drew, 1977). A presença de maltose no meio também pode ter auxiliado no desenvolvimento do fungo. Ferreira et al. (2015) estudaram o comportamento de *T. minioluteus* em cultivo no meio ISP2 e obtiveram resultados de coeficiente de rendimento Y_{x/s} de 0,58 g_{cel}/g_{sub} e de velocidade específica de crescimento de 0,0872 h⁻¹. Os valores

encontrados de $Y_{x/s}$ foram similares, mas a velocidade específica de crescimento deste trabalho foi menor. O inóculo utilizado por Ferreira e colaboradores foi 10 vezes maior e pode ter sido a razão de tal diferença.

Segundo Demain (1977) quando se tem duas fontes de carbono distintas o composto mais simples, ou seja, de fácil assimilação, é utilizado primeiramente para o crescimento celular. A medida que esse componente nutricional reduz sua concentração o microrganismo passa a consumir a segunda fonte de carbono. Considerando que ele já está adaptado ao meio e desenvolvido, e com o metabolismo primário menos ativo, o consumo da segunda fonte de carbono é destinado para a produção metabólitos secundários.

O segundo maior valor de biomassa foi observado no meio G3 na presença de glicose como única fonte de carbono, cerca de 5,67 g/L em 72 horas de fermentação, com $\mu_{\max}$ de 0,048 h⁻¹ e $Y_{x/s}$ 0,34 g_{cel}/g_{sub}. Observou-se nesse meio que os valores de pH tiveram um decréscimo nas primeiras 20 horas de fermentação, podendo ter sido responsável pelo crescimento mais lento do microrganismo em relação aos demais meios. Durante o crescimento microbiano tem-se a produção de ácidos orgânicos que em excesso retardam o desenvolvimento do microrganismo pela redução drástica do pH do meio. Esta condição pode ter reduzido a velocidade de crescimento celular. A menor concentração celular foi obtida no cultivo G2, com 3,55 g/L em 40 horas de fermentação, resultando em $\mu_{\max}$ e $Y_{x/s}$ de 0,057 h⁻¹ e 0,49 g_{cel}.g_{sub}⁻¹, respectivamente. Observou-se nesse último meio que mesmo com o término da fermentação ainda havia presença de substrato. A partir de 48 horas, o fungo parou de consumir glicerol. Mas a partir deste tempo de cultivo observou-se também a morte celular. Ou seja, o fungo não estava nem crescendo, nem se mantendo viável, por isso não consumiu substrato.

Neste trabalho observou-se que os meios contendo glicose tiveram o maior crescimento celular, sugerindo que o fungo tem preferência por este carboidrato como fonte para crescimento. Mesmo no meio contendo amido, que é um polissacarídeo formado por resíduos de glicose, o crescimento foi próximo aos meios contendo glicose. Ao contrário deste estudo, Penariol, Monteiro e Pitelli (2008) observaram que o amido foi a fonte de carbono que promoveu maior crescimento do fungo *Bipolaris euphorbiae*, seguido por glicose, sacarose, maltose e lactose. Comparando os resultados dos dois estudos pode-se inferir que cada microrganismo possui um comportamento particular de crescimento diante da fonte de carbono.

Em todos os cultivos, observou-se uma tendência de aumento dos valores de pH próximo da metade do tempo total de fermentação. Sabe-se que após o consumo da fonte de carbono do meio, os

microrganismos tendem a degradar os lipídeos e proteínas presentes para conseguir sobreviver. Como visto no tópico 4.1.2 os meios eram compostos também por fontes proteicas. Segundo Tortora, Funke e Case (2005) no catabolismo de proteínas estas são desaminadas por enzimas específicas, liberando um ácido orgânico e amônia, que é posteriormente convertida a íon amônio (NH_4^+). Essa produção de compostos básicos pode ser um dos motivos pelo qual ocorreu o aumento do pH após o estágio de maior crescimento microbiano.

A produção de pigmento por *T. minioluteus* foi maior no meio contendo glicerol (G2) (5,23 UA), justificando os maiores valores de coeficiente de rendimento $Y_{P/S}$, cerca de 2,15 UA/g. Este meio também proporcionou a maior produtividade P_M de 0,10 UA/h. Valores próximos de produção (5,12 UA) e rendimento (2,03 UA/g) foram obtidos em meio ISP2, mas a produtividade foi menor, de 0,086 UA/h. A menor concentração de pigmento foi obtida no meio contendo apenas glicose como fonte de carbono (G3), de 1,35 UA, e também a menor produtividade, de 0,02 UA/h. Nesse último meio observou-se crescimento celular até o término do processo de fermentação, podendo inferir que o fungo *T. minioluteus* utilizou o substrato mais para crescimento e desenvolvimento, do que para a produção de pigmento.

A produção do pigmento iniciou quando o fungo atingiu a fase estacionária de crescimento (ISP2, A1RDP1 e G2) ou quando houve redução da velocidade de crescimento celular (G3 e G2). Assim, a produção do pigmento apresentou uma característica típica de metabólito secundário. Observou-se também que o aumento na velocidade de produção coincidiu com o início do aumento do pH do meio, devido à liberação de compostos básicos pela célula, que pode ser resultado da degradação de proteínas, como já comentado.

Neste trabalho, observou-se outro comportamento típico de metabólito secundário: as fontes de carbono que favorecem o crescimento celular (ou o metabolismo primário) normalmente inibem/reprimem a produção do metabólito secundário. O meio com glicose foi um dos meios de maior crescimento celular (metabolismo primário ativo), mas apresentou a menor produção, enquanto o meio contendo glicerol foi o que se observou menor crescimento e maior produção de pigmento (metabolismo secundário mais ativo).

A relação cinética entre crescimento e produção dependerá do papel do produto no metabolismo celular: se ele é um metabólito primário, cuja produção é associada ao crescimento, ou secundário, cuja produção pode ser parcialmente associada ou não associada ao crescimento. (BADINO; CRUZ, 2012). Observou-se neste trabalho (Figura 5) que no meio ISP2 (glicose e maltose) a formação do produto foi não associada ao crescimento celular. Nos demais meios de

cultivo - G3 (glicose), G2 (glicerol) e A1RDP1 (amido) - observou-se a formação de produto parcialmente associada ao crescimento.

Romano (2015) estudou o crescimento e a produção de pigmento por *T. minioluteus* em diferentes meios de cultura em 72 h de cultivo. Nos meios com maior concentração da fonte de carbono ele observou maior crescimento em relação à produção. No meio ISP2 (4 g/L de glicose e 10 g/L de extrato de malte), a razão Cx/Cp em 72 h de cultivo foi 1,8. Nos meios MEA (20 g/L de glicose e 20 g/L de extrato de malte) essa razão foi de 3,8 e no meio CZAPEK (30 g/L de sacarose) foi de 9,9. Talvez a alta concentração da fonte de carbono simples inibiu o metabolismo secundário e por isso obteve-se produção mais baixa. Assim como os resultados obtidos no meio G3 deste trabalho, podendo também ter ocorrido inibição pelo substrato.

No final da fermentação observou-se que nos cultivos ISP2, G2 e G3 houve redução na concentração de pigmento. Este comportamento pode ser explicado pela degradação fotoquímica desses compostos que em soluções aquosas se deterioram em alguns dias (PASTRANA *et al.*, 1995).

Os pigmentos vermelhos produzidos por *Monascus sp.* são os corantes naturais mais utilizados nos países orientais e são candidatos promissores como substitutos de corantes sintéticos na indústria alimentícia. Nos estudos encontrados na literatura sobre produção destes pigmentos em fermentação submersa, as concentrações de pigmento foram medidas em 480 nm, não sendo assim possível comparar os resultados com os obtidos neste trabalho. Entretanto, estes estudos são de extrema relevância para compreender o processo de produção e comportamento desse fungo, por ser um dos microrganismos mais estudados para produção de pigmentos.

Meinicke (2008) estudou a produção de pigmentos pelo fungo *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando o glicerol e a glicose em cultivos submersos. O autor observou a maior produção de pigmento (11,5 UDO₄₈₀) e biomassa (6,15 g/L) no cultivo com 20 g/L de glicose e menor produção (6,27 UDO₄₈₀) e biomassa (5,13 g/L) no cultivo contendo a mesma concentração de glicerol, comportamento inverso ao observado na produção de pigmento por *Talaromyces minioluteus*. Para a mesma espécie de microrganismo *Monascus*, Moritz (2005) avaliou a produção de pigmento em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 30 g/L) para cada uma das fontes de carbono: glicose, maltose e frutose. Os substratos glicose em 20 g/L e maltose em 30 g/L foram mais promissores para a produção de pigmento (2,56 UDO₄₈₀) e (3,21 UDO₄₈₀), respectivamente, mostrando que para *Monascus*, as maiores concentrações de substrato favoreceram a produção do pigmento. Os resultados deste estudo mostraram que a produção de pigmento por *Monascus sp.* foi associada ao crescimento

celular e, conseqüentemente, os cultivos que apresentaram melhor rendimento em biomassa foram os que produziram maiores quantidades de pigmentos vermelhos.

Segundo Drew e Demain (1977) fontes de carbono complexas favorecem a produção de metabólitos secundários. A fonte de carbono com maior complexidade dentre as empregadas neste trabalho foi o amido. Contudo, as fontes de carbono mais simples, ou seja, de fácil assimilação, tiveram melhores rendimentos de biomassa e produção nos estudos deste trabalho. O meio contendo glicerol como fonte de carbono resultou na produção de pigmento mais elevada e na menor concentração de biomassa.

5. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que para cada uma das fontes de carbono utilizadas (glicerol, glicose, maltose e amido) o fungo *Talaromyces minioluteus* comportou-se de maneira diferente, tanto no crescimento celular quanto na produção de pigmento vermelho. A maior produção de pigmento foi observada no meio G2 quando se utilizou o glicerol como fonte de carbono. Observou-se em todos os cultivos que a produção de pigmento iniciou-se após a fase de crescimento do microrganismo, confirmando que o mesmo possui a característica típica de metabólito secundário. A queda do pH pela produção de ácidos orgânicos durante o crescimento microbiano pode ter afetado a produção de pigmento no meio G3 tendo glicose como única fonte de carbono.

O fungo obteve maior crescimento celular nos meios em que a glicose estava presente em suas composições, podendo inferir-se que *Talaromyces minioluteus* possui afinidade por esse substrato de fácil assimilação para seu crescimento. A maior transformação de substrato em biomassa foi observada no meio IPS2 na presença dos dois substratos glicose e maltose. O glicerol presente no meio G2 foi a fonte de carbono que menos favoreceu o crescimento celular do fungo, mas dentre os cultivos estudados foi o que apresentou maior produção de pigmento.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para aumentar o rendimento do processo de produção de pigmento por *Talaromyces minioluteus* e tentativa de futura produção em escala industrial, são feitas as seguintes sugestões:

- 1 Estudar a produção de pigmento vermelho utilizando a glicose e o glicerol juntos em concentrações diferentes;
- 2 Realizar ensaios de produção utilizando a maltose como substrato;
- 3 Realizar o controle do pH com solução tampão;
- 4 Estudar a possibilidade de adição de aminoácido no meio produtivo;
- 5 Realizar ensaios com maior concentração de amido;
- 6 Aumentar a quantidade de esporos inoculados na etapa de reativação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIVOS E INGREDIENTES. CORANTES. Editora Insumos. p. 28-39, 2011.

ANTUNES, T. C. et al. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 131-138, abr./jun. 2013.

BADINO, A. C. J.; CRUZ, A. J. G. Reatores químicos e bioquímicos. São Carlos, 2012. 190p.

BARBARATO, J. **Estudo da obtenção de carotenoides por fermentação empregando a levedura *Rhodotorula* sp em melão e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura.** Trabalho Conclusão de Curso - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

BRASIL. **Resolução - CNNPA nº 44, de 1977.** Publicada DOU - Seção I, 01/02/78. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/44_77.htm. Acesso 20 de abril de 2017.

BRASIL. **Resolução nº 04, de 24 de novembro de 1988.** Publicada D.O.U – Seção I – 19.12.88. Disponível em: http://www.sucodeuvadobrasil.com.br/legislacao/Res_04_CNS.pdf. Acesso 20 de abril de 2017.

BRAKHAGE, A. A. **Regulation of fungal secondary metabolism.** Nature Reviews Microbiology. Advance online publication, November, 2012.

BÜCHI G.; WHITE J. D.; WOGAN G. N. The structures of mitorubrin and mitorubrinol. **Journal of the American Chemical Society**, p. 3484–3489. August 5, 1965.

CARLSON, M. **Regulation of glucose utilization in yeast.** Curr Opin Genet Dev.(1998). Vol. 8,p. 560.

CARVALHO, J.C. et. al. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal** ,v. 29, p. 262-269, Abril 2006.

CARVALHO, M. P.; ABRAHAM, W. R.; MACEDO, A. J. Microrganismos em favor da saúde. **Liberato: educação, ciência e tecnologia**, Rio Grande do Sul, p.77-81, maio 2008.

CARO, Y. et al. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. **Nat. Prod. Bioprospect**, n. 2, p. 174–193, 2012.

CHAKRABORTY, S.; GHOSH, U.; CHAKRABORTY, S. Fungi: Its importance in biotechnology -A review on its past, present and future prospects. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 12, p. 3059-3060, 2010.

CHATTERJEE, S. et al. Characterization of red pigment from *Monascus* in submerged culture red pigment from *Monascus Purpureus*. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 5, n. 12, p. 2102-2108, 2009.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

COSTA, J. P. V.; VENDRUSCOLO, F. Production of red pigments by *Monascus ruber* CCT 3802 using lactose as a substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 50-55, 2017.

CUNHA, F. G. **Estudo da extração mecânica de bixina das sementes de urucum em leite de jorro**. 2008. 92p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

DEMAIN, A. L. **Induction of microbial secondary metabolism**. Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA, 1998.

DEMAIN, A. L.; DREW, S. W. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.*, vol 31, p. 343-56, 1977.

DUFOSSÉ, L. **Microbial Production of Food Grade Pigments**. Food Technol. Biotechnol, 2006.

DUFOSSÉ, L. et. 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, Setembro 2005.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMODARAN, S. Química de Alimentos de Fennema. 4ª Edição. Artmed Editora S.A. Porto Alegre, 2010.

FERREIRA A. G. et al. BB 12. Estudo cinético de produção de pigmento em fungo filamentoso. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, vol. 36 Supl. 1, Agosto, 2015.

FUJIWARA C. Pigmentos naturais dos alimentos: conheça os benefícios. Disponível em: <https://www.natue.com.br/natuelife/pigmentos-naturais-dos-alimentos-conheca-os-beneficios.html>. Acessado 28 de abril de 2017.

FURTADO, M. **Corantes**: Indústria de corantes adere aos corantes naturais. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/corantes-industria-de-alimentos-adere-aos-corantes-naturais/>. Acessado 28 de abril de 2017.

GANCEDO, J. M. Yeast Carbon Catabolite Repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 2, vol. 62, p. 334–361, June 1998.

GOMES, D. C. **Produção de esclerotiorina por *Penicillium Sclerotiorum* e obtenção de derivados com aplicação potencial em alimentos**. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

GUTIÉRREZ, S. Transcription of the *pcbAB*, *pc6C* and *pende* genes of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78 is repressed by glucose and the repression is not reversed by alkaline pHs. **Microbiology**, v.145, p. 317-324, 1999.

HAJJAJ, H. et al. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 619-625, nov. 2000.

HOFFMEISTER, D.; KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Natural Product Reports**, issue 2, June, 2006.

INOUE, O.O. et al. Carbon catabolite repression of retamycin productions by *Streptomyces olindensis* ICB20. **Journal of Microbiology**, vol. 38, p. 58-61, October, 2007.

JEONG H, et al. Geomic blueprint of Hahella chejuensis, a marine microbe producing na algicidal agent. **Nucleic Acids Research**, vol 33, n 22, p. 7066-73, November, 2005.

JONSBU, E.; MCINTYRE, M.; NIELSEN, J. The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. **Journal of Biotechnology**, vol. 95, p.133–144, December, 2002.

KUMAR et al. Microbial pigments: production and their applications in various industries. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, Índia, v. 5(1), p. 203-212, 2015.

KUZHANDAIVELU N. et al. The signal for glucose repression of the lactose-galactose regulon is amplified through subtle modulation of transcription of the kluyveromyces lactis kl-gal4 activator gene. **Molecular And Cellular Biology**, vol. 12, p.1924-1931. May 1992.

LAKSHMI, C. G. **Food coloring: the natural way**. Research Journal of Chemical Sciences, vol. 4(2), p. 87-96, Fevereiro, 2014.

LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 28, p. 44-51, March 1988.

LINS, J. C. L. **Produção e caracterização de prodigiosina isolada de *Serratia marcescens* UCP 1549**. Dissertação (Mestre em ciências biológicas) - Universidade federal de Pernambuco, Recife, 2010.

LITMAN, T. G. Peru busca ser líder mundial em corantes naturais. Disponível em: <http://br.fashionnetwork.com/news/Peru-busca-ser-lider-mundial-em-corantes-naturais,666739.html>. Acesso em 13 de agosto de 2017.

MABROUK A. M. et al. Production of textile reddish brown dyes by fungi. **Malaysian Journal of Microbiology**, vol 7(1) 2011, pp. 33-40.

MAPARI, S. A. S. et al. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potencial natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 231-238, 2005.

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

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

MELO, P. S. et. al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In vitro Cellular Development Biology Animal**, vol. 36, p. 539-543, Setembro 2000.

MENDONÇA J. N. **Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias**. 2011. 121p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORITZ, D. E. **Produção do pigmento monascus por *Monascus ruber* cct 3802 em cultivo submerso**. 2005. 150p. Tese (Doutor em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NETTO, R. C. M. **Dossiê corantes**. FOOD INGREDIENTS BRASIL, n. 9, 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/106.pdf>. Acesso em: 18 de abril de 2017.

OLIVEIRA L. M. et al. Avaliação de diferentes meios de cultura na produção de hexapeptídeo por *Streptomyces cebimarensis*. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa**, Fortaleza, Ceará, Setembro, 2015.

OROZCO, S. F. B.; KILIKAN, B. V. Effect of pH on citricin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802. **Word Journal of Microbiololy & Biotechnology**, v.24, p. 263-268, 2008.

PACIFICO, D. G. P.; FERREIRA, E.; KILIKIAN, B. V. Influência da velocidade específica de crescimento de *Monascus purpureus* ATCC36928 na produção de pigmentos vermelhos. **Simpósio Nacional de Bioprocessos - Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 15, Recife, 2005.

PASTRANA, L. et al. Production of Red Pigments by *Monascus ruber* in Synthetic Media with a Strictly Controlled Nitrogen Source. **Process Biochemistry**, v.30, n.4, p. 333-341, 1995.

PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A. Crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae* cultivado sob diferentes condições nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1907-1913, out, 2008.

PURWADARIA, T.; GUNAWAN, L.; GUNAWAN, A. The production of nata colored by *Monascus purpureus* J1 pigments as functional food. **Microbiology Indonesia**, v. 4, n. 1, p. 6-10, Abril, 2010.

PITLOVANCIV et al. Condições de cultivo e produção de pigmentos por *Chromobacterium violaceum*. **Biotemas**, v. 19, p. 13-18, Março de 2005.

PRETTI, T. S. **Otimização das condições de cultivo do fungo *Aspergillus nidulans* para produção de melanina usando resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

RENHE, I. R. T. et. al. Monascus na nutrição e saúde. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v.17, n.3, p.337-343, Janeiro, 2006.

PURWADARIA, T.; GUNAWAN, L.; GUNAWAN, A. W. The production of nata colored by *Monascus purpureus* J1 pigments as functional food. **Microbiol.** vol. 4, p. 6-10, Idonesia, 2010.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. **Editora Edgard Blucher**, 2 ed., p. 184, São Paulo, 2007.

ROCHA, D. S.; REED, E. Pigmentos Naturais em Alimentos e sua Importância para a Saúde. Goiânia, v. 41, n. 1, p. 76-85, jan./mar. 2014.

ROMANO, L. H. **Bioprospecção de microrganismos endófitos isolados de *Tabelubia* spp. e *Hymenacea courbaril* e identificação da produção de metabólitos de interesse biotecnológico**. Tese (Doutor em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

RONNE, H. Glucose repression in fungi. **TIG**, vol. 11, n. 1, January, 1995.

RUIZ, B. et al. Produção do Pigmento Monascus por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.

SÁ, R. A. **Estudo da produção de metabólitos secundários por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Agosto, 2005.

SAMSON R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, p. 159–183, 2011.

SANTOS, A. M. **Regulação do transporte de lactose em *Kluyveromyces lactis* ja6**. 2013. 63p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia)- Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2013.

SCHUSTER, A; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SILVA, S. R. S. **Produção de pigmentos carotenoides por *Rhodotorula* spp. em fermentação submersa utilizando glicerina residual**. Dissertação (Mestre em Biotecnologia Industria) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SONJAK, S.; URSIC, V.; FRISVAD, J.; GUNDE-CIMERMAN, N. *Penicillium mycobiota* in arctic subglacial ice. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 2, p. 207-216, 2006.

SOUZA, R. M. **Corantes naturais alimentícios e seus benefícios à saúde**. 2000. 65 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Farmácia do Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, Dezembro, 2012.

SQUINA, F.M. **Estudos dos carotenoides de leveduras do gênero *Rhodotorula*: Desenvolvimento de método analítico, influência de inibidores e cultivo em meio alternativo a base de caldo de cana-de-açúcar**. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2001.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 100-110, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8ª ed. 182p.

ÚBEDA, B. T. **Estudo da produção de carotenoides pela bactéria *Kocuria rhizophila***. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

VALDUGA E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, vol. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VENDRUSCOLO, F. **Produção de pigmento vermelho a partir de pigmento laranja produzido por *Monascus ruber cct 3802***. 2009. 245p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

VENIL, C. K., ZAKARIA, Z. A., AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre, v. 48, p. 1065 – 1079, 2013.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.1, p. 157-166, Araraquara, jan./mar. 2009.

WITNEY, F. R.; FAILLA, M. L.; WEINBERG E. D. Phosphate Inhibition of Secondary Metabolism in *Serratia marcescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1042-1046, May. 1977.

YILMAZ, N. et al. Taxonomia polifásica do gênero *Talaromyces*. **Viga. Mycol.**, vol. 78, p. 175-341, 2014.

ZENEBON, O. et al. Determinação de metais presentes em corantes e pigmentos utilizados em embalagens para alimentos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, n. 63, p. 56-62, 2004.