

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium*
purpurogenum DPUA 1275

Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

Co-orientadora:
Prof. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos-Ebinuma, Valéria de Carvalho

S237p Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 / Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma. -- São Paulo, 2013.
223p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica.

Orientador: Pessoa Junior, Adalberto

Co-orientador: Teixeira, Maria Francisca Simas

1. Fungo : Biotecnologia 2. Produtos biotecnológicos :
Purificação I. T. II. Pessoa Junior, Adalberto, orientador III.
Teixeira, Maria Francisca Simas, co-orientador.

620.8 CDD

Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma

Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium
purpurogenum* DPUA 1275

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dr. Adalberto Pessoa Junior
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*A minha Família: minha mãe Marina,
meus irmãos Paulo e Rafael e meus
sobrinhos Victor e Mayara. Obrigada
pelo carinho e incentivo.*

*Ao meu marido, Gustavo, pelo amor
paciência, força e amizade.*

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Adalberto Pessoa Junior pela orientação, confiança, apoio, incentivo e disponibilidade sempre apresentada ao longo de todos os anos de trabalho.

À Professora Maria Francisca Simas Teixeira, pela doação do micro-organismo *Penicillium purpurenum* DPUA 1275 pertencente à Coleção de Cultura do Departamento de Micologia da Universidade Federal do Amazonas e pela possibilidade de desenvolver parte deste trabalho no Laboratório de Parasitologia da UFAM. À excelente orientação, amizade, confiança e incentivo durante todo o trabalho, que tanto colaboraram para meu crescimento pessoal e profissional.

I would also like to thank Professor Paula Jauregi, for mentoring not also during the period that I remained at Reading University but also personal growth. Thank you for the friendship and confidence.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e a bolsa de doutorado, a Fundação CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche e o CNPq pelo apoio financeiro.

À Professora Inês Conceição Roberto pelo conhecimento e auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, em especial Dedé, Ge e Lets, muito obrigada por todos os conselhos, discussões, estímulo, carinho e, principalmente, pelas risadas. Aos amigos do laboratório Jão, Valkerzinho, César, Rafinha, Camilinha, Marcelo, Luciana, Sonia, Eduardo, Fábio e Pedro. E não poderia deixar de agradecer ao Marcelito (Marcelo Matsudo) pelas conversas, incentivo, estímulo, risadas e inúmeras ajudas durante o período do doutorado.

Aos queridos amigos Daniela Viana (Danoca), Jorge Pereira, Carolina Alves (Germes), Raquel Pedrosa, Joseana, Francislene, Lívia Seno e Cinthia Hoch, que estiveram sempre ao meu lado durante este período apesar da distância.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas, Larissa Kirsch, Kilma, Rosana, Taciana, Meire, Anacy, Thayana, Jéssica, Mircela, Ritinha, Helen, Ana Julia, Larissa, Rosimar, Raiane, Tamiris, Nelly, Lorisa, Professor Antonio, Felipe, e a todos os outros que me

proporcionaram uma agradável convivência, além da amizade, aprendizado e companheirismo.

I would like to thank all friends I made at Reading University : Hristina, Gurjot, Noura, Barbara, Virginia, Nasser, Fiseha, Francesco, Cid, Ali, Kairul, Carmen, Maria Dermiki, Tayyibee, Giulia, Sandra, Catarina, Edna, Nazia, Maria, Laura, Agustín, Roberto, Isidro, Daniela, Juliana, Dora, Diana, Adele, Beer, Holly, Katerina, Martín, Giota, Simoni and other friends from Reading, Juliana, Leonardo, Ricardo, Simon, Mata, Gunesh, Rogério, Aldo, Mata, Rumie and Stephen. They all contributed a lot to make my experience in Reading enjoyable and overall very fruitful. Thank you for all the friendship and all the moments lived. You will live forever in my heart.

Não poderia deixar de agradecer pelo carinho, esforço e eficiência dos secretários da Pós-Graduação da FCF, Michel e, em especial, a Elaine e ao Jorge pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Miriam, Elza, Juarez, Gledson e Ivani, que sempre foram muito atenciosos e auxiliaram no que foi preciso.

Aos técnicos do semi-industrial Alex Oliveira e Luiz pela amizade e auxílio.

Aos professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, sobretudo os do semi-industrial.

Aos familiares do meu marido, em especial, Mariza, Daniel, Carla, Bruno, Leonardo e a pequena Laura.

A minha cunhada Adriana, as minhas amigas de infância Queila e Késia, as minhas primas/amigas Nívia e Vanessa e ao Makson Mykael, o meu muito obrigado pelo incentivo, amizade e carinho.

Dentre esta caminhada do doutorado, diversas pessoas passaram pela minha vida e só tenho a agradecer a cada uma delas. Espero não ter esquecido nenhum amigo ou colaborador porque cada um de vocês tem uma grande importância na minha vida e devo a vocês muito do que sou hoje.

Agradeço por tudo e a todos que me ajudaram de alguma forma neste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO.....	iii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT	xix
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
Objetivo geral	3
Objetivos específicos	3
2. Capítulo I	5
1.1 Revisão da literatura	5
1.1.1 Colorantes.....	5
1.1.1.1 Histórico	5
1.1.1.2 Cor e estrutura	7
1.1.1.3 Mercado de colorantes.....	8
1.1.1.4 Colorantes naturais.....	9
1.1.1.4.1 Colorantes naturais de origem microbiana	10
1.1.2 Reino Fungi.....	13
1.1.2.1 <i>Penicillium purpurogenum</i>	17
1.1.3 Cultivo submerso	18
1.1.3.1 Agitação e aeração em cultivos submersos.....	19
1.1.4 Processos de separação e purificação de bioprodutos.....	20
1.1.4.1 Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)	21
1.1.4.1.1 Diagrama de fase	22
1.1.4.1.2 Sistema Polimérico Polietileno glicol-Poliacrilato de Sódio.....	23
1.1.4.2 <i>Colloidal Gas Aphrons</i> (CGA)	26
1.1.4.2.1 Surfactantes.....	26
1.1.4.2.2 Estrutura das <i>Colloidal Gas Aphrons</i> (CGA).....	27

1.1.4.2.3 Estabilidade e caracterização de CGA	29
2. CAPÍTULO II - Condições do cultivo submerso para a produção de colorantes naturais alternativos por um novo isolado <i>Penicillium purpurogenum</i> DPUA 1275	31
2.1 Resumo.....	31
2.2 Introdução	32
2.3 Materiais e métodos.....	33
2.3.1 Reagentes.....	33
2.3.2 Reativação do micro-organismo e autenticação	34
2.3.3 Composição do meio	34
2.3.4 Condições do cultivo submerso	35
2.3.5 Métodos analíticos	35
2.3.6 Parâmetros calculados.....	36
2.3.7 Análise estatística	37
2.4 Resultados e discussão	37
2.4.1 Cultivo monospórico e autenticação do <i>P. purpurogenum</i> DPUA 1275.....	37
2.4.2 Influência do tempo de incubação, do tipo e do tamanho do inóculo na produção de colorantes.....	38
2.4.3 Curva de crescimento	42
2.4.4 Estudo de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.....	46
2.5 Conclusão	51
3. CAPÍTULO III - Seleção das condições de cultivo submerso visando à produção de colorantes por <i>Penicillium purpurogenum</i>	52
3.1 Resumo.....	52
3.2 Introdução	53
3.3 Materiais e métodos.....	55
3.3.1 Reagentes.....	55
3.3.2 Micro-organismo	55
3.3.3 Meio de cultura e preparo do inóculo.....	55
3.3.4 Métodos analíticos	56
3.3.5 Planejamento fatorial	56
3.4 Resultados e discussão	59
3.4.1 Primeiro planejamento fatorial para a produção dos colorantes	59
3.4.2 Segundo planejamento fatorial fracionário para produzir colorantes naturais.	66
3.4.3 Planejamento fatorial completo.....	68

3.4.4	Planejamento fatorial composto central para produzir colorantes naturais.....	71
3.5	Conclusão	74
4.	CAPÍTULO IV - Otimização da produção de colorantes vermelhos por nova cepa de <i>Penicillium purpurogenum</i> em cultivo submerso e o efeito de diferentes parâmetros em sua estabilidade.....	75
4.1	Resumo.....	75
4.2	Introdução	76
4.3	Materiais e métodos.....	78
4.3.1	Reagentes.....	78
4.3.2	Manutenção do micro-organismo, cultivo submerso e meio de cultivo.....	78
4.3.3	Planejamento fatorial	79
4.3.4	Característica dos colorantes vermelhos	80
4.3.5	Interação entre os colorantes vermelhos e os polímeros.....	81
4.3.6	Métodos analíticos	81
4.4	Resultados e discussão	82
4.4.1	Planejamento estatístico central composto.....	82
4.5	Caracterização parcial dos colorantes vermelhos.....	86
4.6	Efeito do pH na estabilidade dos colorantes vermelhos.....	87
4.6.1	Efeito da temperatura na estabilidade dos colorantes vermelhos....	89
4.6.2	Estabilidade dos colorantes vermelhos em diferentes tipos e concentrações de sais	90
4.6.3	Interação dos colorantes vermelhos a diferentes tipos e concentrações de polímeros	92
4.7	Conclusão	93
5.	CAPÍTULO V - Extração de colorantes vermelhos produzidos por cultivo submerso de <i>Penicillium purpurogenum</i> DPUA 1275 usando sistemas poliméricos de duas fases aquosas.....	95
5.1	Resumo.....	95
5.2	Introdução	96
5.3	Materiais e métodos.....	98
5.3.1	Reagentes.....	98
5.3.2	Manutenção do micro-organismo.....	98
5.3.3	Meio de cultura e preparo do inóculo.....	99
5.3.4	Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA).....	99
5.3.4.1	Curvas binodais	99
5.3.4.2	Partição.....	100

5.3.5	Métodos analíticos	101
5.3.5.1	Análise da produção de colorantes vermelhos	101
5.3.5.2	Determinação da concentração de proteína total	101
5.3.6	Análise da extração	101
5.3.7	Estatística	102
5.4	Resultados e discussão	102
5.4.1	Curvas binodais para SDFA PEG/NaPA.....	102
5.4.2	Estudos de partição	105
5.4.2.1	Estudos de partição para sistema PEG 1.000/NaPA 8.000/diferentes sais.....	106
5.4.2.2	Estudos de partição para Sistema PEG6.000/NaPA8.000/diferentes sais.....	109
5.4.2.3	Estudos de partição para sistema PEG 10.000/NaPA 8.000/diferentes sais.....	113
5.4.2.4	Estudos de partição variando o tipo de PEG/NaPA 8.000/diferentes sais.....	116
5.5	Conclusão	120
6.	CAPÍTULO VI - Separação de colorantes vermelhos produzidos por cultivo submerso de <i>Penicillium purpurogenum</i> DPUA 1275 usando <i>Colloidal Gas Aphrons</i>	122
6.1	Resumo.....	122
6.2	Introdução	123
6.3	Materiais e métodos.....	126
6.3.1	Materiais	126
6.3.2	Manutenção do micro-organismo e fermentação.....	126
6.3.3	Composição do meio	127
6.3.4	Geração de CGA	127
6.3.5	Caracterização das CGA	128
6.3.5.1	<i>Gas hold up</i>	128
6.3.5.2	Estabilidade	128
6.3.6	Recuperação dos colorantes vermelhos a partir do meio fermentado de <i>Penicillium purpurogenum</i> usando CGA	128
6.3.7	Interação entre os colorantes vermelhos e os surfactantes.....	130
6.3.8	Solubilidade relativa dos colorantes vermelhos em solventes orgânicos	131
6.3.9	Coeficiente de partição octanol-água.....	131
6.3.10	Métodos analíticos	132

6.3.10.1	Determinação dos colorantes vermelhos.....	132
6.3.10.2	Determinação da concentração de proteína total	132
6.3.11	Determinação de açúcar total	133
6.4	Resultados e discussão	133
6.4.1	Caracterização de CGA.....	133
6.4.2	Interação entre os colorantes vermelhos e os surfactantes.....	135
6.4.3	Solubilidade e coeficiente de partição octanol-água dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de <i>Penicillium purpurogenum</i> em diferentes solventes	137
6.4.4	Partição dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado.....	139
6.4.5	Partição dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado usando CGA generada por CTAB 2 mM: efeito do pH.....	142
6.4.6	Partição dos colorantes vermelhos, presentes no meio fermentado, solubilizados em diferentes condições usando CGA generada por Tween 20 (20 mM).....	145
6.5	Conclusão	149
7.	CAPÍTULO VII - Estudo de variáveis que influenciam a produção de colorantes naturais por cultivo submerso de <i>Penicillium purpurogenum</i> em biorreator.....	150
7.1	Resumo.....	150
7.2	Introdução	151
7.3	Materiais e métodos.....	152
7.3.1	Reagentes.....	152
7.3.2	Micro-organismo	152
7.3.3	Meio de cultura	153
7.3.4	Produção de colorantes naturais por cultivo submerso em biorreator.....	153
7.3.5	Métodos analíticos	154
7.3.5.1	Determinação da sacarose, pH e colorantes	154
7.3.6	Parâmetros calculados.....	154
7.4	Resultados e discussão	155
7.4.1	Produção de colorantes naturais por cultivo submerso em biorreator.....	155
7.4.1.1	Produção de colorantes naturais por cultivo submerso em biorreator: influência da alteração do pH na fase de produção	161
7.5	Conclusão	165

8. Capítulo VIII	166
8.1 Considerações finais	166
9. Referências Bibliográficas	169
1. Apêndice.....	195
1.1 Apêndice A. Estabelecimento da Metodologia de Determinação da Concentração de Sacarose.....	195
1.2 Apêndice B.....	196
1.3 Apêndice C.....	197
1.3.1 Apêndice C.1. Biomassa, consumo de sacarose, pH e produção de colorantes para o planejamento fatorial completo 2^{4-1}	197
1.3.2 Apêndice C.2. Biomassa, consumo de sacarose, pH e produção de colorantes para o planejamento fatorial completo 2^3	198
1.3.3 Apêndice C.3. Biomassa, consumo de sacarose, pH e produção de colorantes para o planejamento fatorial composto 2^2	199

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** O espectro eletromagnético na faixa visível. Comprimentos de onda maiores (700 nm) correspondem aos vermelhos, enquanto comprimentos de onda menores (400 nm) correspondem ao violeta FONTE: Carvalho (2004). ... 8
- Figura 2.** *Penicillium citrinum* Thom. Aspecto micromorfológico FONTE: Lacaz et al. (2002). 14
- Figura 3.** Diagrama de fases para um sistema de duas fases aquosas. Binodal (—□—), linha de ligação (—●—), região de uma fase (A), região de duas fases e composição total do sistema (B), sendo B' e B'' as composições das fases superior e inferior do sistema e ponto crítico (C)..... 23
- Figura 4.** Estrutura química dos surfactantes Dodecil sulfato de sódio (SDS), Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) e Tween 20. 26
- Figura 5.** Estrutura proposta por SEBBA (1987)..... 28
- Figura 6.** Aspecto morfológico de *P. purpurogenum* DPUA 1275: A) estruturas celulares observadas em microscópico óptico; aspecto macroscópico em meio Agar-água (B), CYA (C) e YES (D). Todos os crescimentos foram realizados durante 7 dias, a 25°C (autoria própria). 38
- Figura 7.** Concentração de biomassa a diferentes tempos de incubação [0 (barras brancas), 120 (barras cinza claras), 216 (barras cinza escuras) e 288 (barras mescladas) horas] durante cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 com discos de micélio (A) e suspensão de esporos (B) como método de inoculação. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 40
- Figura 8.** pH a diferentes tempos de incubação [0 (barras brancas), 120 (barras cinza claras), 216 (barras cinza escuras) e 288 (barras mescladas) horas] durante cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 com discos de micélio (A) e suspensão de esporos (B) como método de inoculação. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 41
- Figura 9.** Consumo de sacarose (quadrado) e curva de crescimento de *P. purpurogenum* DPUA 1275 (triângulo) utilizando como método de inoculação suspensão de esporos (símbolo cheio) e discos de micélio (símbolo vazio) em função do tempo de cultivo submerso. 42
- Figura 10.** Comportamento do pH ao longo do crescimento do *P. purpurogenum* DPUA 1275 em função do meio de cultivo em meio CYA utilizando como método de inoculação suspensão de esporos (Δ) e discos de micélio (■)..... 43
- Figura 11.** Produção de colorantes amarelos (◇), laranjas (□) e vermelhos (○) por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 utilizando como método de inoculação suspensão de esporos (símbolos cheios) e discos de micélio (símbolos vazios). 44

- Figura 12.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais velocidade de agitação (1), pH (2), temperatura (3), concentração de sacarose (4) e extrato de levedura (5) e tempo de incubação (6) sobre as variáveis respostas: produção dos colorantes amarelos (A), laranjas (B) e vermelhos (C), tendo como variável-resposta a produção do colorantes vermelhos. 62
- Figura 13.** Biomassa (barra cinza), consumo de sacarose (▲) e pH (barras listradas) dos ensaios realizados no planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} 65
- Figura 14.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a produção dos colorantes amarelos (A), laranjas (B) e vermelhos (C). 69
- Figura 15.** Superfície de resposta do planejamento experimental central composto para os colorantes amarelos (A), laranjas (B) e vermelhos (C). 72
- Figura 16.** Estrutura química dos colorantes vermelhos produzidos por *Monascus* FONTE: Mapari et al. (2009). 77
- Figura 17.** Biomassa (▲), consumo de sacarose (■), pH (◆) e produção de colorantes vermelhos (barras cinzas, UA_{490nm}) para os ensaios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H) e ponto central (I) do planejamento fatorial central composto 2^2 84
- Figura 18.** Superfície de resposta do planejamento fatorial central composto 2^2 para a variável-resposta colorantes vermelhos. 86
- Figura 19.** Estabilidade dos colorantes vermelhos a diferentes níveis de pH (◆-pH 3,0; ■-pH 4,0; ▲-pH 5,0; ●-pH 6,0; *-pH 7,0; □-pH 8,0; ○-pH 9,0; Δ-pH 10,0) em função do tempo. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. Todos os ensaios foram determinados a 25°C. 87
- Figura 20.** Estabilidade dos colorantes vermelhos a diferentes temperaturas (◆-25°C; ■-30°C; ▲-40°C; ●-50°C; ◇-60°C; □-70°C; Δ-80°C; ○-90°C) em função do tempo. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 89
- Figura 21.** Estabilidade dos colorantes vermelhos a diferentes tipos e concentrações de sais [sem suplementação (■), NaCl 0,1M (■), NaCl 0,5M (■), Na_2SO_4 0,1M (■) e Na_2SO_4 0,5M (□)]. 91
- Figura 22.** Estabilidade dos colorantes vermelhos na presença de diferentes tipos e concentrações de PEG (◆-PEG 1.000 5%; ◇-PEG 10.000 15%; ●-PEG 6.000 5%; ○-PEG 6.000 15%; ■-PEG 10.000 5%; □-PEG 10.000 15%; ▲-sem PEG) em função do tempo. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. Todos os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine pH 8,0/25°C. 92
- Figura 23.** Estabilidade dos colorantes vermelhos na presença de diferentes concentrações de NaPA 800 g/mol (◆-5; ■-15 % p/p) em função do tempo. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. Todos os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine pH 8,0/25°C. 93

Figura 24. Curva Binodal para os sistemas formados por NaPA 8.000 g/mol/PEG 1.000 (A), 6.000 (B) e 10.000 (C) g/mol na presença de NaCl 0,1 (■), NaCl 0,5 (□), Na₂SO₄ 0,1 (▲) e Na₂SO₄ 0,5 M. Os pontos experimentais usados nas partições estão representados por x e o respectivo número da condição experimental. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 103

Figura 25. Coeficiente de partição do sistema PEG1.000/NaPA8.000 g/mol em tampão McIlvaine pH 8,0 na presença de diferentes tipos e concentrações de sais: NaCl 0,1 M (barras brancas), NaCl 0,5 M (barras cinza claro), Na₂SO₄ 0,1 M (barras cinza escuro), Na₂SO₄ 0,5 M (barras pretas). As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C. 107

Figura 26. Coeficiente de partição do sistema PEG 6.000/NaPA 8.000 g/mol em tampão McIlvaine pH 8,0 na presença de diferentes tipos e concentrações de sais: NaCl 0,1 M (barras brancas), NaCl 0,5 M (barras cinza claro), Na₂SO₄ 0,1 M (barras cinza escuro), Na₂SO₄ 0,5 M (barras pretas). Todos os experimentos foram realizados a 25 °C. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos..... 110

Figura 27. Coeficiente de partição do sistema PEG 10.000/NaPA 8.000 g/mol em tampão McIlvaine pH 8,0 na presença de diferentes tipos e concentrações de sais: NaCl 0,1 M (barras brancas), NaCl 0,5 M (barras cinza claro), Na₂SO₄ 0,1 M (barras cinza escuro), Na₂SO₄ 0,5 M (barras pretas). As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C. 114

Figura 28. Coeficiente de partição do sistema formado por diferentes massas molares de PEG/NaPA 8.000 g/mol em tampão McIlvaine pH 8,0 na presença dos sais: NaCl 0,1M, NaCl 0,5M, Na₂SO₄ 0,1M, Na₂SO₄ 0,5 M. PEG 1.000 (barras brancas), 6.000 (barras mescladas) e 10.000 (barras pretas) Da. Todos os experimentos foram realizados a 25°C. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos..... 117

Figura 29. Seletividade de proteínas (Se) no sistema formado por diferentes massas molares de PEG e na presença de NaPA 8.000 g/mol em tampão McIlvaine pH 8,0 na presença dos sais: NaCl 0,1M, NaCl 0,5M, Na₂SO₄ 0,1M, Na₂SO₄ 0,5 M. PEG 1.000 (barras brancas), 6.000 (barras mescladas) e 10.000 (barras pretas) g/mol. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos..... 119

Figura 30. Estrutura química dos surfactantes Dodecil sulfato de sódio (SDS), Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) e Tween 20..... 123

Figura 31. Estrutura proposta por Sebba (1987). 124

Figura 32. Estrutura química dos colorantes vermelhos produzidos por *Monascus* FONTE: Mapari et al. (2009). 126

Figura 33. Estabilidade dos colorantes vermelhos na presença de diferentes surfactantes e ao longo de 24 horas: controle (sem surfactante, ◆), Tween 20

mM (■), SDS 2 mM (▲), CTAB 2 mM [pH 6,9 (●), pH 8,0 (*), pH 9,0 (□), pH 10,0 (○)]. Todos os ensaios foram realizados a 25°C. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos..... 136

Figura 34. Solubilidade dos colorantes vermelhos obtidos por cultivo submerso de *P. purpurogenum* em diferentes solventes. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos..... 138

Figura 35. Log K_{OW} dos colorantes vermelhos obtidos do meio fermentado de *P. purpurogenum* em uma faixa de pH de 4,0 a 10,0. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos..... 138

Figura 36. Comparação da recuperação (A) e do coeficiente de partição (B) dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* usando CGA geradas por Tween 20, 20 mM (barras brancas), SDS 2 mM (barras cinzas) e CTAB 2 mM (barras pretas) como uma função da razão volumétrica. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 140

Figura 37. Estudo do efeito do pH na recuperação na fase aphron (η_{aphron} , A) e do coeficiente de partição (K, B) dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* através de CGA geradas por CTAB 2 mM na razão volumétrica de 6 (□) e 12 (■). Os surfactantes foram dispersos em água (pH 6,9), tampão Mcllvaine (pH 8,0) e tampão carbonato-bicarbonato de sódio (pH 9,0 e 10,0). As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 142

Figura 38. Recuperação na fase aphron (η_{aphron} , A) e coeficiente de partição (B) dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* dispersos em Tween 20 20 mM (%v/v): 20:80 (barras brancas), 40:60 (barras cinza claro), 60:40 (barras cinza escura) e sem diluição (barras cinza clara) usando CGA geradas por Tween 20, 20 mM na razão volumétrica de 6 e 12. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos..... 145

Figura 39. Recuperação na fase aphron (η_{aphron} , A) e coeficiente de partição (K, B) dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* dispersos em etanol (%v/v): 20:80 (barras brancas), 40:60 (barras cinza) e sem diluição (barras pretas) usando CGA geradas por Tween 20 (20 mM) na razão volumétrica de 6 e 12. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos..... 147

Figura 40. Produção de colorantes amarelos (barras cinza-escuras), laranjas (barras cinza-claras) e vermelhos (barras brancas) por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 em biorreator variando a velocidade de agitação em função do tempo..... 156

Figura 41. Consumo de sacarose (A) e pH (B) ao longo do tempo do cultivo submerso do *P. purpurogenum* em biorreator variando a velocidade de agitação..... 159

Figura 42. Produção de colorantes amarelos (barras pretas), laranjas (barras cinza-escuras) e vermelhos (barras cinza-claras), e variação do pH (▲) em

função do tempo durante cultivo submerso do *P. purpurogenum* DPUA 1275 em biorreator na velocidade de agitação de 300 rpm. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos..... 162

Figura 43. Produção de colorantes amarelos (barras pretas), laranjas (barras cinza escuro) e vermelhos (barras cinza claro), e variação do pH (▲) em função do tempo durante cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 em biorreator numa velocidade de agitação de 500 rpm. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos..... 163

Figura 44. Produção de colorantes ao longo do tempo no cultivo submerso do *P. purpurogenum* em biorreator na velocidade de agitação de 500 rpm. 165

Figura 45. Curva de calibração de absorbância em função da concentração de sacarose obtida experimentalmente..... 195

Figura 46. Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para a inoculação com suspensão de esporos. 196

Figura 47. Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para a inoculação com discos de micélio. 196

Figura 48. Biomassa (▲), consumo de sacarose (■), pH (◆) e produção de colorantes amarelos (barras brancas, $UA_{400\text{nm}}$), laranjas (barras mescladas, $UA_{470\text{nm}}$) e vermelhos (barras cinzas, $UA_{490\text{nm}}$) para os ensaios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H) e ponto central (I) do planejamento fracionário 2^{4-1} 197

Figura 49. Biomassa (▲), consumo de sacarose (■), pH (◆) e produção de colorantes amarelos (barras brancas, $UA_{400\text{nm}}$), laranjas (barras mescladas, $UA_{470\text{nm}}$) e vermelhos (barras cinzas, $UA_{490\text{nm}}$) para os ensaios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H) e ponto central (I) do planejamento fatorial completo 2^3 198

Figura 50. Biomassa (▲), consumo de sacarose (■), pH (◆) e produção de colorantes amarelos (barras brancas, $UA_{400\text{nm}}$), laranjas (barras mescladas, $UA_{470\text{nm}}$) e vermelhos (barras cinzas, $UA_{490\text{nm}}$) para os ensaios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H) e ponto central (I) do planejamento fatorial central composto 2^2 199

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Produção microbiana de colorantes Fonte: Dufossé (2006). 12

Quadro 2. Diferentes tipos de produtos industriais obtidos por fungos FONTE: El-Enshasy (2007). _____ 16

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Solubilidade de alguns compostos em água à temperatura igual a 30°C FONTE: Bailey e Ollis (1986). _____ 19
- Tabela 2.** Produção de colorantes naturais em diferentes métodos de inoculação (suspensão de esporos e discos de micélio) e tempo de incubação por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275. Os erros correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. _____ 39
- Tabela 3.** Resultados dos parâmetros de cultivo para a seleção da metodologia de inoculação. _____ 45
- Tabela 4.** Produção de colorantes naturais em diferentes métodos de inoculação (suspensão de esporos e discos de micélio) e tempo de incubação por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275. Os erros correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. _____ 46
- Tabela 5.** Produção de colorantes naturais em diferentes métodos de inoculação (suspensão de esporos e discos de micélio) e tempo de incubação por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275. Os erros correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. _____ 49
- Tabela 6.** Variáveis e níveis dos fatores usados nos planejamentos fatoriais 2^{6-2} , 2^{4-1} e 2^3 para estudar a produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos em cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275. _____ 57
- Tabela 7.** Níveis dos fatores utilizados no primeiro e no segundo planejamentos centrais compostos do tipo 2^2 no estudo das melhores condições de cultivo para a produção de colorantes naturais por *P. purpurogenum* DPUA 1275. _ 58
- Tabela 8.** Combinação dos níveis das seis variáveis independentes (velocidade de agitação, pH, temperatura, sacarose, extrato de levedura e tempo de cultivo) usadas no planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} e suas respectivas respostas (colorantes amarelos, laranjas e vermelhos). _____ 60
- Tabela 9.** Análise de variância aplicada aos modelos de regressão usados para a produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos em função de pH, velocidade de agitação e concentração de sacarose e extrato de levedura, de acordo com planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . _____ 66
- Tabela 10.** Matriz do planejamento 2^2 e as respostas Colorantes amarelos (UA_{400nm}), Colorantes laranjas (UA_{470nm}) e Colorantes vermelhos (UA_{490nm}). _ 71
- Tabela 11.** Valores de p para as variáveis independentes na produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275. _____ 73
- Tabela 12.** Níveis dos fatores utilizados no primeiro e no segundo planejamentos centrais compostos do tipo 2^2 no estudo das melhores condições de cultivo para a produção de colorantes naturais por *P. purpurogenum* DPUA 1275. _____ 79

Tabela 13. Matriz do planejamento 2² e as respostas colorantes amarelos (UA_{400nm}), colorantes laranjas (UA_{470nm}) e colorantes vermelhos (UA_{490nm}). _ 83

Tabela 14. Condições experimentais para a partição dos colorantes vermelhos para os PEG com diferentes massas molares no SPDFA _____ 100

Tabela 15. Balanço de Massa (BM, %), rendimento na fase PEG (η_{TOP} , %) e razão volumétrica (R) para a partição dos colorantes vermelhos em sistema polimérico contendo PEG 1.000 e NaPA 8.000 g/mol em diferentes concentrações de ambos os polímeros e na presença de diferentes tipos e concentrações de sais. _____ 106

Tabela 16. Balanço de massa (BM, %), rendimento na fase PEG (η_{TOP} , %) e razão volumétrica (R) para a partição dos colorantes vermelhos em sistema polimérico PEG 6.000/NaPA 8.000 g/mol em diferentes concentrações de ambos os polímeros e na presença de diferentes tipos e concentrações de sais. _____ 109

Tabela 17. Balanço de massa (BM, %) e rendimento obtido na fase PEG (η_{TOP} , %) para a partição dos colorantes vermelhos em sistema polimérico PEG 10.000/ NaPA 8.000 g/mol em diferentes concentrações de ambos os polímeros e na presença de diferentes tipo e concentrações de sais. _____ 113

Tabela 18. Balanço de massa (BM, %) e rendimento obtido na fase PEG (η_{TOP} , %) para a partição do colorantes vermelhos em sistema polimérico PEG (1.000, 6.000 e 10.000)/ NaPA 8.000 g/mol com 12% de cada um dos polímeros e na presença de diferentes tipo e concentrações de sais. Os sistemas foram preparados em tampão Mcllvaine pH 8,0, à temperatura de 25 °C. _____ 118

Tabela 19. Efeito dos surfactantes SDS (2 mM), Tween 20 (20 mM) e CTAB (2mM, pH 6,90, 8,0, 9,0 e 10,0) na caracterização das CGA. _____ 134

Tabela 20. Seletividade em relação às proteínas (Se_P) e aos açúcar (Se_A) a diferentes níveis de pH (6,9, 8,0, 9,0 e 10,0) e razões volumétricas (R, 6 e 12). Os erros correspondem a 95% do limite de confiança para as medidas. ____ 144

Tabela 21. Seletividade em relação às proteínas (Se_P) e ao açúcar (Se_A) para os colorantes vermelhos dissolvidos em Tween 20 e etanol e sem diluição (condição controle) a diferentes razões volumétricas (R, 6 e 12). Os erros correspondem a 95% do limite de confiança para as medidas. _____ 148

Tabela 22. Parâmetros cinéticos calculados durante o cultivo submerso de *P. purpurogenum* em biorreator para a produção de colorantes amarelos (CA, UA_{400nm}), colorantes laranjas (CL, UA_{470nm}) e colorantes vermelhos (CV, UA_{490nm}). _____ 160

Tabela 23. Parâmetros cinéticos calculados durante o cultivo de submerso de *P. purpurogenum* em biorreator para a produção de colorantes amarelos (CA, UA_{400nm}), colorantes laranjas (CL, UA_{470nm}) e colorantes vermelhos (CV, UA_{490nm}). _____ 164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPUA	Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas
CYA	Agar Extrato de Levedura Czapek
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato (sacarose) a células
$\mu_{m\acute{a}x}$	velocidade máxima de crescimento
$Y_{P/X}$	fator de conversão de célula em produto
P_e	produção específica obtida na máxima absorbância de cada colorante
$X_{m\acute{a}x}$	concentração celular máxima(g/L)
X_0	concentração celular inicial
X^*	concentração celular ao longo da fase exponencial
S_0	concentração inicial de substrato
S_f	Concentração final de substrato
$Abs_{m\acute{a}x}$	absorbância máxima dos colorantes (UA)
Abs_0	absorbância inicial dos colorantes (UA)
UA	Unidades de absorbância
t	Tempo (h)
CA	colorantes amarelos
CL	Colorantes laranjas
CV	Colorantes vermelhos
$Y_{P/S}$	fator de conversão de substrato (sacarose) a produto
P	produtividade
RCV	resíduo dos colorantes vermelhos
Abs_{AT}	absorbância dos colorantes vermelhos antes do tratamento
Abs_{BT}	absorbância dos colorantes vermelhos depois do tratamento
ANOVA	Análise de variância
PEG	Polietileno glicol
NaPA	Poliacrilato de sódio
SDFA	Sistemas de duas fases aquosos
K	coeficiente de partição dos colorantes
Se_P	seletividade em relação a proteínas
BM	Balanço de massa
η_{TOP}	recuperação na fase top
SPDFA	Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas
BCA	<i>Bicinchonic Acid</i>
R	Razão volumétrica

V_{PEG}	volume na fase PEG (<i>top</i>)
V_{NaPA}	volume na fase NaPA (<i>bottom</i>)
CGA	Colloidal gas aphrons
SDS	Dodecil sulfato de sódio
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CMC	Concentração micelar crítica
ε	<i>Gas hold up</i>
V_{aphron}	volume na fase <i>aphron</i>
V_{a0}	volume da fase da dispersão
τ	tempo de meia vida
η_{FA}	recuperação na fase <i>aphron</i>
$(\text{Abs}_{490})_{\text{MF}}$	absorbância dos colorantes vermelhos a 490 nm no meio fermentado inicial
$(\text{Abs}_{490})_{\text{FA}}$	absorbância dos colorantes vermelhos a 490 nm na fase <i>aphron</i>
$(\text{Abs}_{490})_{\text{FL}}$	absorbância dos colorantes vermelhos a 490 nm na fase líquida
V_{FA}	Volume na fase <i>aphron</i>
V_{FL}	Volume na fase líquida
V_{MF}	Volume inicial adicionado do meio fermentado
K_{CGA}	coeficiente de partição dos colorantes vermelhos
K_{PROT}	coeficiente de partição em termos de proteínas
K_{A}	coeficiente de partição em termos de açúcares
P_{FA}	concentração de proteínas na fase <i>aphron</i>
P_{FL}	concentração de proteínas na fase líquida
Se_{PROT}	Seletividade proteínas
Se_{A}	Seletividade proteínas
A_{FA}	concentração de açúcares na fase <i>aphron</i>
A_{FL}	concentração de açúcares na fase líquida
CO	percentagem de colorantes que resistiu ao tratamento
CO_{sol}	absorbância remanescente na solução, no respectivo intervalo de tempo
CO_{ini}	absorbância inicial do meio
K_{OW}	coeficiente de partição octanol-água
Abs_{FO}	absorbância dos colorantes vermelhos a 490 nm na fase octanol
Abs_{FA}	absorbância dos colorantes vermelhos a 490 nm na fase aquosa
BSA	albumina de soro bovino
LD_{50}	Dose letal mediana
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto

RESUMO

Santos Ebinuma, V.C. **Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275**. 2013. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Há interesse mundial no desenvolvimento de pesquisas envolvendo produção e extração de colorantes naturais, devido a sérios problemas de segurança industrial associados ao uso de colorantes sintéticos. Este trabalho objetivou produzir colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 por cultivo submerso (em frascos agitados e em biorreator) e estudar a extração dos colorantes vermelhos. Para a produção, os estudos iniciais mostraram que 5 discos de micélio, sacarose e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, e 336 horas de cultivo eram condições adequadas para a produção dos colorantes. Visando à otimização da produção, realizaram-se planejamentos fatoriais, com as variáveis independentes: tempo de cultivo; velocidade de agitação; pH; temperatura; concentração de sacarose e de extrato de levedura. As variáveis-respostas foram produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos. Dos resultados obtidos, as variáveis mais significativas ao processo foram concentrações de extrato de levedura e de sacarose. A produção dos colorantes vermelhos foi otimizada, alcançando a produção de 2,97 UA_{490nm}, nas condições 48,90 e 11,80 g/L de sacarose e extrato de levedura, respectivamente, 30°C, pH 4,5 150 rpm e 336 horas de cultivo. Nos experimentos em biorreator, o melhor resultado foi obtido na frequência de agitação de 500 rpm e na mudança do pH do meio para 8,0, após 96 horas de bioprocessamento. Ademais, avaliou-se a estabilidade dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado em diferentes condições (pH, temperatura, sais, polímeros e tensoativos). Referente a pH e temperatura, os colorantes vermelhos mostraram-se mais estáveis nas condições alcalinas e a 70 °C. Tanto os sais (NaCl e Na₂SO₄) quanto os polímeros (PEG 1.000, 6.000 e 10.000 g/mol e NaPA 8.000 g/mol a 5 e 15%) e os tensoativos (Tween 20, CTAB e SDS) não causaram perda da cor nas condições avaliadas. Estudos de solubilidade e de coeficiente de partição octanol-água mostraram que os colorantes vermelhos apresentam solubilidade superior em solventes polares e característica mais hidrofílica. Nos estudos de extração, as técnicas avaliadas foram Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA) formados pelo sistema PEG/NaPA e *Colloidal Gas Aphrons* (CGA). Pela primeira técnica, os colorantes vermelhos migraram preferencialmente para a fase PEG. Os polímeros PEG 6.000 g/mol, na presença de NaCl 0,1 e 0,5 M, e PEG 10.000 g/mol, com Na₂SO₄ 0,5M, se destacaram dentre as condições analisadas com coeficiente de partição (K) próximo a 13, em ambos os casos, e seletividade de proteínas (Se_P) próximas a 3. Para a técnica de CGA, o CTAB proporcionou os melhores resultados, seguido do Tween 20. Porém, o valor de K foi inferior ao obtido com SPDFA, com um máximo de 5 (CTAB 2 mM/pH 9,0). Os resultados obtidos demonstram um novo produtor de colorantes naturais, as quais têm potencial de aplicação em diversos segmentos industriais. Ademais, os resultados obtidos mostraram a eficiência das técnicas utilizadas para extração dos colorantes vermelhos, com destaque para SPDFA, que apresentou maiores valores de K.

Palavras-chave: colorantes naturais; fungos filamentosos; cultivo submerso; extração líquido-líquido; polímeros; surfactantes.

ABSTRACT

Santos Ebinuma, V.C. **Production and extraction of natural colorants from *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275**. 2013. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

There is worldwide interest in developing research projects involving the production and extraction of natural colorants due to serious safety problems associated with industrial use of synthetic ones. The aim of this work was to investigate the production of natural colorants from *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 by submerged culture (rotatory shaker and bioreactor) besides studying the red colorants extraction. To the production step, initial studies showed that 5 agar mycelial discs, sucrose and yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively, and 336 hours of bioprocess promoted the best results. To optimize the colorants production a serie of factorial designs were performed. The independent variables studied were: fermentation time, agitation speed, pH, temperature, sucrose and yeast extract concentration under the responses production of yellow, orange and red colorants. From these results, the most significant variables for the process were sucrose and yeast extract concentration. The red colorants production was optimized achieving 2.97 UA_{490nm}, in the following conditions: 48.90 and 11.80 g/L of sucrose and yeast extract, respectively, 30 °C, 4.5 pH, 150 rev min⁻¹ and 336 hours of culture. In the experiments performed in bioreactor, the condition that promoted the best results was 500 rpm and pH adjusted for 8.0 after 96 hours of bioprocess. Furthermore, we evaluated the red colorants stability at different conditions (pH, temperature, salts, polymers and surfactants). Concerning to pH and temperature, the red colorants were more stable under basic conditions and 70 °C; not only the salts (NaCl and Na₂SO₄) but also the polymers (PEG 1000, 6000 and 10000 g/mol and NaPA 8000 g/mol) and the surfactants (Tween 20, CTAB and SDS) not promoted loss of color upon the conditions evaluated. Studies of red colorants solubility and octanol water coefficient showed that these compounds exhibit a higher solubility in polar solvents and present hydrophilic characteristics. Subsequently, the extraction of red colorant was evaluated through two extraction methods: Polymeric Systems Aqueous Two Phase (ATPS) composed by PEG and NaPA and *Colloidal Gas Aphrons* (CGA). For the first technique, the red colorant preferentially migrated to the PEG phase. The best results were obtained with PEG 6000 g/mol in the presence of 0.1 to 0.5 M NaCl and with PEG 10000 g/mol with 0.5 M Na₂SO₄. To both cases the partition coefficient (K) was close to 13 and the Selectivity in terms of proteins (Se_P) was close to 3. For the CGA technique, CTAB gave the best results followed by Tween 20. However, the K values were lower than the ones obtained with ATPS with a maximum of 5 in the following condition: CTAB 2 mM/pH 9.0. For the Se_P, the values obtained for both techniques were close. The results above show a new producer of natural colorants which have potential application in various industries. Moreover, the results show the efficiency of the techniques used to extract the red colorants, especially to ATPS that presented higher K values.

Key-words: natural colorants; filamentous fungi; submerged culture; liquid-liquid extraction; polymers; surfactants.

INTRODUÇÃO

Colorantes sintéticos e naturais são usados extensivamente nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e têxtil (HAILEI *et al.*, 2011; MAPARI *et al.*, 2005). Atualmente, os colorantes naturais têm ganhado destaque sobre os sintéticos, pois os últimos podem ser tóxicos em diferentes extensões, podendo apresentar ação mutagênica e/ou carcinogênica, causar urticárias e alergias, além de haver relação funcional entre sua ingestão e o aumento na velocidade e na duração do comportamento de hiperatividade (KONGRUANG, 2011).

Colorantes naturais podem ser obtidos a partir de plantas, insetos e micro-organismos; contudo, o interesse por esses últimos tem se destacado em relação aos demais (MAPARI *et al.*, 2006). Colorantes produzidos por micro-organismos, dentre eles os fungos, podem assegurar a produção do metabólito de interesse, acompanhada por condições controladas, independentemente de fatores externos e abastecimento sazonal de matérias-primas, e com potencial para minimizar as variações na produção (MAPARI *et al.*, 2010).

A diversidade de colorantes fúngicos difere não somente em relação as estruturas químicas, mas também pela vasta faixa de cores que eles podem produzir e serem aplicados (MAPARI *et al.*, 2009). Os colorantes fúngicos são metabólitos secundários que, muitas vezes, não têm função conhecida (MAPARI *et al.*, 2010). Recentemente, tem sido reportado que cepas de *Penicillium* são potenciais produtores de colorantes naturais (MAPARI *et al.*, 2008; MAPARI *et al.*, 2010; HAILEI *et al.*, 2011; MÉNDEZ *et al.*, 2011). Além disso, outros estudos confirmam que *Penicillium purpurogenum* não produz micotoxinas durante o cultivo laboratorial (MAPARI *et al.*, 2009) e tem a capacidade de produzir colorantes naturais com significativa atividade antimicrobiana e ausência de toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina* (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Assim, o conhecimento das melhores condições de cultivo, como pH, temperatura, velocidade de agitação, e dos melhores nutrientes para promover o crescimento celular e a produção do metabólito de interesse é importante para aumentar a produção dos colorantes.

Além da etapa de produção, pesquisas envolvendo a extração de novos colorantes, utilizando novos métodos, são de grande interesse. Nos últimos anos, vêm-se ampliando a utilização dos métodos de extração líquido-líquido

em sistemas aquosos com a finalidade de extrair moléculas, sejam elas biologicamente ativas ou não (SANTOS *et al.*, 2011). A extração líquido-líquido, de forma geral, consiste em um processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para outra fase líquida imiscível em contato com a primeira. Para tanto, se propõe a adição de polímeros hidrofílicos, que formam os chamados Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA), ou a adição de surfactantes não iônicos às soluções aquosas, o que leva ao estabelecimento de duas fases aquosas imiscíveis (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003).

Os SPDFA se separam em duas fases aquosas quando dois polímeros (por exemplo, PEG e dextrana) ou um polímero e um sal apropriado (por exemplo: fosfato ou citrato) são misturados e determinadas condições termodinâmicas críticas sejam estabelecidas, isto é, uma faixa específica de temperatura, pressão e composição dos constituintes. A alta concentração de água (entre 70 e 90%) em tais sistemas favorece a estabilidade de moléculas bioativas durante a separação, quando comparado com sistemas de duas fases em solventes orgânicos (JOHANSSON, 1998; HATTI-K'AUL, 2000).

Neste contexto, métodos mais adequados de produção e extração de colorantes a partir de fungos merecem ser estudados. Ademais, a base científica deve ser incrementada para a industrialização destes produtos de origem biotecnológica, principalmente no mercado nacional. Desta maneira, este trabalho visa estudar o cultivo submerso em frascos agitados e biorreator, para obtenção de novos colorantes por *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275, e realizar investigação inicial sobre o processo de purificação destas biomoléculas do meio fermentado por métodos de extração líquido-líquido alternativos, nomeadamente Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA) e *Colloidal Gas Aphrons* (CGA).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar a produção e a extração de colorantes naturais obtidos a partir de cultivo submerso de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275.

Objetivos específicos

- Produção dos colorantes naturais amarelos, laranjas e vermelhos
- Cultivo monospórico e autenticação de *P. purpurogenum* DPUA 1275
- Cultivo submerso em agitador rotativo (*shaker*):
 - avaliação de parâmetros (tempo de cultivo, tipo e tamanho do inóculo)
 - cinética de crescimento; avaliar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio
 - planejamento experimental estatístico, avaliando as variáveis independentes: concentração de extrato de levedura e sacarose, temperatura, pH, tempo de cultivo e velocidade de agitação sobre as variáveis respostas: colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, visando a otimização da produção
- Cultivo submerso em biorreator: influência da frequência de agitação e do pH na produção dos colorantes naturais em biorreator
- Caracterização dos colorantes vermelhos produzidos por *P. purpurogenum*
 - Estabilidade frente a diferentes faixas de pH: 3,0 a 10,0
 - Estabilidade frente a diferentes temperaturas: 25 – 90°C
 - Estabilidade frente a diferentes tipos e concentrações de sais (NaCl e Na₂SO₄ 0,1 e 0,5 M)
 - Estabilidade frente a diferentes tipos e concentrações de polímeros: PEG 1.000, 6.000 e 10.000 g/mol e NaPA 8.000 g/mol a 5 e 15%
 - Estabilidade frente a diferentes tipos de surfactantes: SDS, Tween 20 e CTAB
 - Solubilidade relativa em solventes orgânicos
 - Coeficiente de partição octanol-água
- Extração por Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas:

- Construção dos diagramas de fases para os sistemas formados por PEG 1.000, 6.000 e 10.000 g/mol e NaPA 8.000 g/mol em diferentes tipos e concentrações de sais
- Extração dos colorantes vermelhos por SPDFA utilizando diferentes condições
- Extração por *Colloidal Gas Aphrons (CGA)*
 - Caracterização da CGA
 - Estudos de partição através de CGA geradas em diferentes condições.

2. CAPÍTULO I

Este capítulo apresenta uma revisão geral e atualizada da literatura, a qual serviu de subsídio para análise e posterior discussão dos resultados apresentados nos demais capítulos. Nele, é possível encontrar vários tópicos, como: a descrição do gênero *Penicillium* e sua capacidade de produzir colorantes; a importância dos colorantes no mercado; e a definição dos sistemas líquido-líquido utilizados na purificação de biomoléculas.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Colorantes

As cores sempre exerceram fascínio sobre a humanidade. Atualmente, a cor tem papel importante na aceitabilidade de produtos comercializados nos diferentes segmentos industriais. Os consumidores inicialmente julgam a qualidade de um produto pela sua cor. O setor industrial, inclusive o alimentício, tem usado, por séculos, aditivos para realçar ou restaurar a aparência original de seus produtos e para garantir uniformidade, como um indicador de qualidade (GOUVEIA *et al.*, 2007).

Os aditivos inseridos para conferir cores nas mais diversas substâncias são os colorantes, que podem ser classificados como pigmentos ou corantes. A diferença básica entre essas duas moléculas está relacionada ao seu tamanho e à sua solubilidade no meio em que estão inseridas (HERBST; HUNGER, 1997, SARON; FELISBERTI, 2006). Os pigmentos possuem, em geral, tamanho de partícula maior e são praticamente insolúveis no meio aplicado, enquanto que os corantes são moléculas solúveis (ULLMANN, 1985).

1.1.1.1 Histórico

O uso de colorantes naturais começou há milhares de anos, havendo evidências entre as civilizações antigas do Egito, da China e da Índia¹. O primeiro corante a ser conhecido pela humanidade foi o Negro de Fumo (*Carbon Black*). Por volta de 3.000 a.C., alguns corantes inorgânicos sintéticos, como o Azul Egípcio, foram produzidos. Sabe-se que os caçadores do Período Glacial pintavam, com fuligem e ocre, as paredes das cavernas reservadas ao

¹ www.ipef.br/tecprodutos/corantes.asp/10-11-2012

culto, criando obras que resistem há milênios². Da mesma maneira, muitas civilizações indígenas americanas utilizavam a pintura dos corpos e dos cabelos como modo de comunicação, enquanto corantes naturais, como bixina, genipina e andirobina, eram utilizados para fins estéticos, religiosos e de proteção (SARON *et al.*, 2006).

Os centuriões romanos utilizavam, em suas capas, corantes vermelhos provenientes do molusco marinho *Murex* sp., enquanto os egípcios e os bretões faziam uso do índigo natural, extraído da planta *Isatis tinctoria*³. Outros corantes também se destacavam, como o açafrão, extraído de plantas, e a cochonilha, obtida de animais (ZHANG *et al.*, 2006).

A história do Brasil está intimamente ligada ao comércio de produtos naturais. Do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*) era obtido um corante de cor vermelha, muito utilizado para tingir roupas e como tinta para escrita. Até o final do século XIX, somente os corantes naturais eram disponíveis, tornando estes produtos valiosos e de enorme interesse dos colonizadores. Neste sentido, além do pau-brasil, muitos outros produtos despertaram interesse nos europeus: a morina, obtida de *Chlorophora tinctoria*, e o índigo, o qual, no Brasil, era extraído da planta *Indigofera tinctoria* (SARON *et al.*, 2006).

Assim, até a metade do século XIX, os colorantes naturais eram essencialmente obtidos dos reinos animal e vegetal. O cultivo de plantas e a criação de animais ou sua coleta junto às fontes naturais, o processamento e a comercialização de materiais colorantes deles obtidos tiveram importante papel socioeconômico no passado.

Em 1856, o químico inglês William H. Perkin sintetizou o primeiro corante orgânico, o Mauve. A partir de então e com o desenvolvimento da alquimia e da química, diversos compostos inorgânicos de forte coloração passaram a ser usados extensivamente como colorantes (ZHANG *et al.*, 2006). Assim, os colorantes naturais foram rapidamente substituídos, devido ao baixo custo decorrente da economia de escala na produção, da flexibilidade de localização perto dos centros consumidores, da homogeneidade da composição e da garantia da qualidade dos colorantes sintéticos⁴.

²<http://www.abiquim.org.br/comissao/setorial/corantes-pigmentos/especificidade/historico-aplicacao>. 10-11- 2012

³ <http://www.abiquim.org.br/comissao/setorial/corantes-pigmentos/especificidade/historico-aplicacao>. 10-11- 2012

⁴ <http://www.ipef.br/tecprodutos/corantes.asp>. 10-11-2012

Em 1900, cerca de 80 pigmentos artificiais eram usados em alimentos (CARVALHO, 2004). Atualmente, existem aproximadamente 7.000 diferentes corantes e pigmentos, enquanto novos são patenteados a cada ano. Colorantes são largamente utilizados nas indústrias têxtil, de papel, de couro e de madeira. Os alimentos, muitas vezes, são coloridos com corantes naturais ou sintéticos que tenham sido aprovados por um órgão regulatório. Entre outros produtos que são coloridos por colorantes podem-se destacar: produtos provenientes do petróleo, tais como ceras, óleos lubrificantes, pomadas e gasolina; amostras biológicas (pele e cabelo); plásticos, resinas e produtos de borracha⁵. Assim, o apelo mercadológico estimula, cada vez mais, o desenvolvimento de novos estudos com o intuito de superar as limitações tecnológicas existentes e aumentar a produção de colorantes (MEINICKE, 2008).

1.1.1.2 Cor e estrutura

A cor de cada colorante está associada à absorção ou à reflexão da luz em comprimentos de onda determinados, o que é uma característica da sua molécula. A interferência com a luz visível está associada a transições eletrônicas dos elétrons de valência (GORDON *et al.*, 1995): a energia (e, conseqüentemente, a frequência e, portanto, a cor) da luz está associada à diferença de energia envolvida entre os estados dos elétrons nessas transições. A cor percebida depende da cor absorvida, de acordo com a complementaridade das cores (CARVALHO, 2004).

A absorção de fótons de luz com energias específicas é um fenômeno bem conhecido e explorado em técnicas de análise como a espectrofotometria. Na prática, quando se trata de substâncias colorantes, há bandas de absorção – faixas de comprimentos de onda, ao invés de linhas espectrais, como em íons inorgânicos simples. No entanto, o princípio de “formação” da cor é o mesmo (CARVALHO, 2004).

⁵ <http://www.scienceclarified.com/Di-EI/Dyes-and-Pigments.html>



Figura 1. O espectro eletromagnético na faixa visível. Comprimentos de onda maiores (700 nm) correspondem aos vermelhos, enquanto comprimentos de onda menores (400 nm) correspondem ao violeta FONTE: Carvalho (2004).

A energia requerida por elétrons capazes de excitação depende do orbital que esses elétrons ocupam e tal energia é menor quando duplas ligações ocorrem. Se uma série de duplas ligações conjugadas está presente, a energia de excitação é ainda menor, a ponto de poder ser promovida pela luz visível – portanto, pode-se observar cor. À medida que o comprimento do sistema de duplas ligações conjugadas aumenta, o comprimento de onda de máxima absorção também aumenta (MARGALITH, 1992; CARVALHO, 2004). Os carotenoides são exemplos de colorantes naturais nos quais estes sistemas conjugados são observados.

Tendo em vista que corantes e pigmentos são compostos complexos, muitas vezes é impossível traduzi-los por uma fórmula química – alguns são misturas de vários compostos e outros não possuem estrutura química definida. Por esse motivo, a nomenclatura química usual raramente é usada, preferindo-se utilizar os nomes comerciais⁶.

1.1.1.3 Mercado de colorantes

O uso histórico de colorantes naturais foi substituído pelo uso de colorantes sintetizados quimicamente no final do século XIX e continuou até o século XX. Todavia, a preocupação com a segurança destes colorantes artificiais tem crescido, devido a sérios problemas de toxicidade dos mesmos, o que gerou numerosas regulamentações em diversos países e resultou na volta dos colorantes naturais ao mercado, principalmente na sua aplicação para o setor alimentício (MAPARI *et al.*, 2010).

O mercado para aplicação de colorantes naturais produzidos por bioprocessos é difícil de ser estimado; apesar de existir preferência, cada vez maior, por aditivos naturais em alimentos e cosméticos, a via de produção

⁶ <http://www.abiquim.org.br/comissao/setorial/corantes-pigmentos/especificidade/historico-aplicacao>. 10 nov. 2012.

natural pode ser, em alguns casos, 10 vezes mais cara que a via sintética (MAPARI *et al.*, 2010).

Dentre os colorantes naturais disponíveis no mercado, o caso mais bem sucedido é o do β -caroteno produzido por microalgas, que tem custo de cerca de U\$1.000/Kg contra U\$ 500/Kg por via sintética. Apesar do preço superior, o β -caroteno produzido por via biotecnológica pode competir em nichos nos quais é importante que todos os ingredientes sejam “naturais”. Ademais, estes colorantes apresentam efeitos terapêuticos contra o câncer – característica que o β -caroteno sintético não apresenta (CARVALHO, 2004).

Atualmente, os colorantes naturais compreendem 31% no mercado de colorantes, enquanto os sintéticos detêm 40% e os idênticos aos naturais 29%. Além disso, a *Leatherhead Food International* (LFI) cita que o mercado para colorantes naturais está crescendo e estes estão prontos para substituir os colorantes sintéticos futuramente. No setor alimentício, o mercado de colorantes, em 2007, era estimado em US\$1,15 bilhão, 2,5% superior ao obtido em 2004 (US\$ 1,07 bilhão). Deste mercado, US\$ 465 milhões eram de colorantes naturais, aumento de 4,6% em relação a 2004 (MAPARI *et al.*, 2010).

1.1.1.4 Colorantes naturais

Nos anos iniciais de aplicação dos colorantes artificiais, não havia regulamentação quanto ao uso ou à pureza dessas substâncias (CARVALHO, 2004). A partir da década de 1980, a preocupação a esse respeito, principalmente na indústria alimentícia, aumentou e estudos toxicológicos começaram a ser realizados. Tais estudos mostraram que os colorantes sintéticos têm sido responsáveis por reações alérgicas e intolerância (WANG *et al.*, 2006), são tóxicos em diferentes extensões (ZHANG *et al.*, 2006), inclusive alguns são potencialmente carcinogênicos, o que representa um possível perigo para humanos quando expostos cronicamente (OSMAN *et al.*, 2004, VELMURUGAN *et al.*, 2010a). Além disso, a produção de colorantes artificiais contribui para a depreciação de fontes não renováveis, como o petróleo (DRIVAS *et al.*, 2011).

Sendo a segurança dos colorantes sintéticos questionada, houve redução do número de colorantes permitidos pelas agências reguladoras de

seu uso em diversos países (BRITTON, 1999; PAN *et al.*, 2009). Assim, há crescente demanda por colorantes não tóxicos, especificamente para aplicações em alimentos e fármacos, em roupas de crianças e de couro (SIVAKUMAR *et al.*, 2009; VELMURUGAN *et al.*, 2010b). Ademais, os colorantes naturais têm atraído amplo interesse na comunidade internacional, pela imagem de serem seguros e de terem potencial efeito saudável (ES-SAFI, 2004).

Os colorantes naturais podem ser obtidos a partir de uma variedade de plantas (BOO *et al.*, 2012; DEVEOGLU *et al.*, 2012), insetos (MARCO; GÄDE, 2010; UNAGUL *et al.*, 2005) e micro-organismos (MASAHIRO *et al.*, 1994; CHO *et al.*, 2002a; VELMURUGAN *et al.*, 2010a; MEINICKE *et al.*, 2012). Na União Europeia, o uso desses colorantes de origem animal e vegetal é autorizado em alimentos (MAPARI *et al.*, 2010). Embora haja número considerável de pigmentos naturais, somente poucos são avaliados em quantidade suficiente para serem utilizados na indústria, porque são usualmente extraídos de plantas (LAURO, 1991; CHO *et al.*, 2002b). De forma específica, prevalecem os cinco colorantes naturais considerados de maior importância no mercado mundial: o urucum, a páprica, a cúrcuma, as antocianinas e o carmim de cochonilha (CONSTANT *et al.*, 2002).

O fato de os corantes naturais de plantas serem extraídos de fontes como cascas de frutas, sementes ou raízes significa que sua produção é dependente da disponibilidade dos materiais naturais para a extração da cor. A lista de pigmentos de fontes naturais é passível de variação e a extração de pigmentos é influenciada pelos métodos de extração empregados. Então, a composição química, incluindo a presença de componentes, e a propriedade de estabilidade dos corantes naturais de plantas variam quanto às fontes de cultivo (MAPARI *et al.*, 2005). Além disso, em muitos casos, a questão da estabilidade em relação ao aquecimento, à luz e ao pH atualmente limitam a aplicação de certos tipos de produtos que preencham os requerimentos de estabilidade do colorantes (MAPARI *et al.*, 2010).

1.1.1.4.1 Colorantes naturais de origem microbiana

Em contraste com as plantas, as algas unicelulares e os fungos são mais promissores para produção biotecnológica, pois podem ser cultivados

usando técnicas de cultivo submerso ou semi-sólido (WISSGOTT; BORTLIK, 1996). Além disso, é vantajoso do ponto de vista econômico e prático produzir colorantes naturais a partir de micro-organismos (CHO *et al.*, 2002a).

Os colorantes obtidos a partir de micro-organismos têm ganhado atenção nas indústrias de alimentos na Europa e nos Estados Unidos devido à sua estabilidade e à possibilidade de aumento de escala (MAPARI *et al.*, 2006). Além disso, colorantes microbianos constituem uma classe de produtos naturais que apresenta vantagem em termos de produção em relação aos seus similares extraídos de vegetais ou animais: o desenvolvimento de espécies vegetais superiores é mais lento que o de micro-organismos e algas; estes não apresentam problema de sazonalidade, visto que seu crescimento pode ser relativamente alto (JACOBSON; WASILESKI, 1994) e a manipulação de seus genes é fácil (VELMURUGAN *et al.*, 2010b). Ademais, os colorantes microbianos são obtidos por processo fermentativo, que é inerentemente o mais rápido e produtivo método de produção comparado a outros processos químicos (VELMURUGAN *et al.*, 2010b).

Micro-organismos e microalgas são produtores de diversas moléculas, tais como carotenoides, melaninas, flavinas, quinonas monascinas, violaceínas, ficocianinas ou índigo. Entretanto, existem diversas etapas a serem percorridas da produção dos colorantes em laboratórios até a chegada aos mercados. O colorante mais antigo que está em uso é o *angkak* ou koji vermelho, arroz transformado pelo fungo *Monascus*, usado na Ásia por séculos como colorante de alimentos para vinho de arroz e queijo de soja vermelho, produtos de carne e de peixes. A primeira história de sucesso na Europa na produção de pigmentos por micro-organismos foi a utilização do fungo *Blakeslea* para a produção de β -caroteno. Entre as microalgas, existem duas histórias bem sucedidas para a produção eficiente de carotenoides, o β -caroteno, usando *Dunaliella*, e a astaxantina, usando *Haematococcus* (DUFOSSÉ *et al.*, 2005). Em relação às ficobiliproteínas ou ficocianinas, existem alguns estudos, como a utilização da alga *Spirulina* na obtenção de pigmentos azuis, antioxidantes e biomassa (MIRANDA *et al.*, 1998).

Dentre os micro-organismos, os fungos produzem enorme quantidade de metabólitos secundários que são importantes na indústria, inclusive na de colorantes. *Monascus purpureus* tem sido utilizado há anos na produção de pigmentos vermelhos (GHORAI *et al.*, 2009). Muitos colorantes com

características de não carotenoides são produzidos por fungos, incluindo quinonas, como antraquinonas e naftoquinonas, di-hidroxi-naftaleno melanina (um agregado complexo de policetídeos) e componentes flavina, como riboflavina. Pigmentos antraquinona e eritroglauцина são produzidos por *Eutotium spp.*, *Fusarium spp.*, *Curvularia lunata* e *Drechslera spp.* Um novo corante natural de origem fúngica, denominado *Arpink RedTM*, está sendo produzido pelo ASCOLOR BIOTECH, na República Tcheca⁷. Os colorantes vermelhos são metabólitos extracelulares da classe das antraquinonas e podem ser produzidos por uma variedade de *Penicillium oxalicum* (MAPARI *et al.*, 2010).

O quadro 1 apresenta alguns exemplos de colorantes produzidos por micro-organismos.

Molécula	Cor	Micro-organismo	Situação ⁸
Anthraquinona	Vermelhos	<i>Penicillium oxalicum</i>	PI
Astaxantina	Vermelhos-rosa	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (levedura), <i>Phaffia rhodozyma</i>	ED
Astaxantina	Vermelhos-rosa	<i>Agrobacterium aurantiacum</i> (bactéria)	PP
Astaxantina	Vermelhos-rosa	<i>Paracoccus carotinifaciens</i> (bactéria)	PP
Cantaxantina	Vermelhos escuro	<i>Bradyrhizobium spp.</i> (bactéria)	PP
Licopeno	Vermelhos	<i>Blakeslea trispora</i> (fungo)	ED
Licopeno	Vermelhos	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (fungo)	PP
Melanina	Preto	<i>Saccharomyces neoformans var. nigricans</i> (levedura)	PP
Monascorubramina	Vermelhos	<i>Monascus spp.</i> (fungo)	PI
Naphtoquinona	Vermelhos sangue	<i>Cordyceps unilateralis</i> (fungo)	PP
Riboflavina	Amarelos	<i>Ashbya gossypii</i> (fungo)	PI
Rubrolone	Vermelhos	<i>Streptomyces echinoruber</i> (bactéria)	ED
Rubropunctatina	Laranjas	<i>Monascus spp.</i> (fungo)	PI
Torularodina	Laranjas- vermelhos	<i>Rhodotorula spp.</i> (levedura)	ED
Zeaxantina	Amarelos	<i>Flavobacterium spp.</i> (bactéria)	ED
Zeaxantina	Amarelos	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> (bactéria)	PP
β -caroteno	Amarelos-laranjas	<i>Blakeslea trispora</i> (fungo)	PI
β -caroteno	Amarelos-laranjas	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (fungo)	PP
β -caroteno	Amarelos-laranjas	<i>Mucor circinelloides</i> (fungo)	ED
β -caroteno	Amarelos-laranjas	<i>Neurospora crassa</i> (fungo)	PP
β -caroteno	Amarelos-laranjas	<i>Phycomyces blakesleeanus</i> (fungo)	PP
Desconhecido	Vermelhos	<i>Penicillium purpurogenum</i> (fungo)	ED
Desconhecido	Vermelhos	<i>Paecilomyces sinclairii</i> (fungo)	PP

Quadro 1. Produção microbiana de colorantes

Fonte: Dufossé (2006).

⁷ <http://www.abiquim.org.br/comissao/setorial/corantes-pigmentos/especificidade/historico-aplicacao>. 10 nov. 2012.

⁸ Produção Industrial (PI), estágio de desenvolvimento (ED), projeto de pesquisa (PP)

1.1.2 Reino Fungi

O Reino Fungi é constituído por um grupo de organismos, cujos membros são formados por células eucarióticas ou eucariontes, que não formam tecidos verdadeiros e sua parede celular é fundamentalmente composta de quitina (TORTORA *et al.*, 2005). Dentro deste reino se encontram os fungos, os quais são heterotróficos e não conseguem sintetizar seu próprio alimento. Dessa forma, os fungos, para seu desenvolvimento, exigem sempre uma fonte orgânica de carbono, que é utilizada como material plástico ou energético. Já a fonte de nitrogênio pode ser inorgânica ou orgânica (LACAZ *et al.*, 2002). Ademais, estes micro-organismos necessitam de outros macronutrientes (S, P, K e Mg), micronutrientes (Fe, Mn, Mo, Ca, Zn e Co) ou fatores de crescimento (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Os fungos são seres aeróbios e o seu metabolismo respiratório envolve mecanismo enzimático complexo, determinando a transferência de elétrons do doador oxidável ao receptor final de hidrogênio, que é o oxigênio molecular. O processo tem início pela glicólise anaeróbia, através do ciclo de Embden-Meyerhoff-Parnas (ou outra via alternativa) até a formação do ácido pirúvico que, por descarboxilação oxidativa, transforma-se na acetilcoenzima A (LACAZ *et al.*, 2002).

As características biológicas dos fungos e as estratégias do seu ciclo de vida constituem, por si só, um dos maiores desafios biotecnológicos. É importante também salientar que a fase de reprodução sexuada típica da maioria dos fungos permite-lhes adaptar-se gradualmente às condições mais desfavoráveis ao seu desenvolvimento, tornando-os mais resistentes e com maiores defesas contra os seus inimigos (MORITZ, 2005).

A classificação dos fungos ocorre de acordo com as características dos esporos sexuais, com os ciclos-de-vida e com as características morfológicas dos micélios vegetativos. Assim, podem ser denominados de fungos perfeitos e imperfeitos. Os fungos perfeitos apresentam todos os estágios sexuais; já os fungos imperfeitos não têm a reprodução sexual descrita (LACAZ *et al.*, 2002).

A disseminação dos fungos ocorre, na maioria das vezes, pela produção de estruturas denominadas esporos (reprodução sexuada) ou conídios (reprodução assexuada), dos mais diversos tipos, formados ou não em estruturas especializadas para essa função, e resultantes de um de seus ciclos

de reprodução. A Figura 2 apresenta o aspecto micromorfológico de fungos do gênero *Penicillium*.

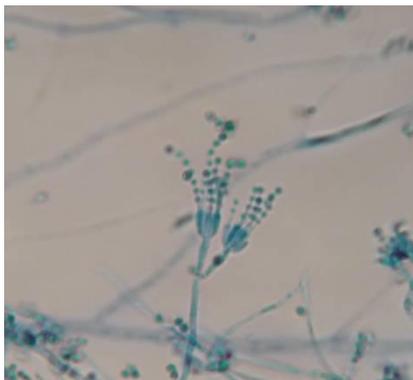


Figura 2. *Penicillium citrinum* Thom. Aspecto micromorfológico
FONTE: Lacaz *et al.* (2002).

O esporo, encontrando um substrato adequado e em condições ambientais ideais (temperatura, umidade, pH, luminosidade), se desenvolve, dando formação a um ou mais tubos germinativos, se for originado do fungo filamentoso, ou a um blastoconídeo, se for originado de um fungo leveduriforme (LACAZ *et al.*, 2002).

Os tubos germinativos desenvolvem-se formando hifas, sendo o conjunto de hifas denominado micélio. O micélio que está em contato com o substrato envolvido, principalmente, com a nutrição do fungo, é denominado micélio vegetativo, enquanto o responsável pela produção de esporos é denominado micélio reprodutor (ou aéreo) (LACAZ *et al.*, 2002). As hifas do micélio vegetativo liberam e absorvem substâncias do substrato necessárias à nutrição do fungo e servem também para fixar o fungo a este substrato. O micélio reprodutivo, responsável pela produção de esporos na mais variadas formas, apresentará alterações morfológicas de acordo com a espécie e a fase de reprodução considerada, sendo que essa diversificação morfológica é que permite a identificação e a classificação dos fungos (MORITZ, 2005).

Os fungos estão classificados no Filo Chytridiomycota, Filo Zygomycota, Filo Ascomycota, Filo Basidiomycota e no grupo deuteromycetes, que representa a forma conidial dos Ascomycota e Basidiomycota (TEIXEIRA *et al.*, 2011). O grupo Ascomycota engloba milhares de espécies de fungos, com representantes: leveduriformes, filamentosos e dimórficos. No caso dos fungos filamentosos, as hifas são septadas, enquanto as leveduras são unicelulares.

Após um fungo filamentoso formar um esporo, este se separa da célula parental e germina, originando um novo fungo filamentoso. Os esporos assexuais são formados pelas hifas de um organismo, enquanto que os sexuais resultam da fusão de núcleos de tipos opostos de cruzamento de uma mesma espécie do fungo (TORTORA *et al.*, 2005).

A reprodução sexual deste grupo é caracterizada pelos esporos (ascosporos) que são produzidos no interior de estruturas denominadas ascos. Os ascos e os ascosporos estão armazenados nos chamados ascocarpos ou ascomas, que podem ser de vários tipos (peritécio, apotécio, cleistotécio e pseudotécio), a depender da espécie. A reprodução assexuada é por meio de conídios produzidos nas extremidades das hifas e dispersos por vento, água, insetos e animais (GOMPertz *et al.*, 2000)

Os fungos, entre outros micro-organismos, obtêm energia pela degradação de fontes de carbono orgânicas. A energia que é liberada pelo catabolismo é armazenada até sua utilização. Assim, pela quebra das ligações químicas dos nutrientes, os micro-organismos obtêm a energia para ser utilizada no seu metabolismo, como na biossíntese de estruturas celulares; síntese de compostos químicos, como enzimas, ácidos nucleicos, polissacarídeos; manutenção celular; crescimento e multiplicação; armazenamento de nutrientes, excreção de produtos e mobilidade (PELCZAR *et al.*, 1996). Dessa forma, os produtos liberados pela degradação podem ser utilizados no metabolismo celular dos micro-organismos e as moléculas mais simples são mineralizadas e redistribuídas nos ciclos biogeoquímicos, como o do carbono, do oxigênio, do nitrogênio e da água.

A versatilidade metabólica dos fungos filamentosos possibilita sua utilização em diversos processos industriais para a produção de ácidos orgânicos, polissacarídeos, enzimas, reguladores de crescimento de plantas, alcaloides, pigmentos, micotoxinas e antibióticos (EL-ENSHASY, 2007). Além disso, esses micro-organismos estão presentes em todos os ambientes e são economicamente importantes no campo da medicina, da fitopatologia e da indústria, além de serem ecologicamente importantes como decompositores (VECCHIA, 2007).

O quadro 2 apresenta alguns produtos industriais produzidos por fungos.

Produto	Micro-organismo
Antibióticos	
Penicilina G e V	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Cefalosporina C	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium patulum</i>
Penicilina N	<i>Emericellopsis sp.</i>
Pleuromutilina	<i>Pleurotus mutilus</i>
Ciclosporina A	<i>Tolepocladium inflatum</i>
Ciclosporin A and B	<i>Cylinrocarpum lucidum</i>
Enzimas	
Glucose oxidase, pectinase e fitase	<i>Aspergillus niger</i>
Xilanase e invertase	<i>Aspergillus awamori</i>
α -Amilase e glucoamilase	<i>Aspergillus oryzae</i>
Celulase e hemicelulase	<i>Trichoderma reesei</i>
Outros metabólitos	
Riboflavina	<i>Ashbya gossypii</i>
Ácido cítrico e glutâmico	<i>Aspergillus niger</i>
Ácido kojico e biotina	<i>Aspergillus oryzae</i>
Ácido itacônico	<i>Aspergillus terreus</i>
Pululana	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Biotina	<i>Fusarium culmorum</i>
Alcaloides do Ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
Ácido giberélico	<i>Giberella fujikuroi</i>
Ácido linoleico	<i>Martierella isabellina</i>
β -caroteno	<i>Phycomyces blakesleanus</i>
Proteínas heterólogas recombinantes	
Interleucina-6 humana	<i>Aspergillus niger</i>
Ativador de Plasminogênio tecidal	<i>Aspergillus niger</i>
Interleucina-6 humana	<i>Aspergillus nidulans</i>

Quadro 2. Diferentes tipos de produtos industriais obtidos por fungos
 FONTE: El-Enshasy (2007).

Historicamente, o gênero *Penicillium* já foi classificado na Subdivisão Deuteromycotina, Classe Deuteromycetes. Posteriormente, estes passaram a ser denominados fungos mitospóricos e, na atualidade, de fungos anamorfos. Segundo as citações de Guarro *et al.* (1999), tornou-se dispensável conservar o termo deuteromycete, pelo menos para os fins de identificação. Essa terminologia foi oficialmente mantida, mas sem o reconhecimento desses fungos particularizado em uma classe; todavia, o grupo Deuteromycete representa a forma conidial dos filos Ascomycota e Basidiomycota (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

O gênero *Penicillium* é composto, com algumas exceções de espécies, por fungos filamentosos amplamente distribuídos em solo, serapilheira e ar. As colônias são caracterizadas pelo rápido crescimento e sua textura pode ser lisa, filamentosa, aveludada, lanosa ou algodonosa, com coloração inicial branca e, após maturação, podendo apresentar-se como azul-esverdeada, cinza-esverdeada, amarela, cor de rosa, dependendo da espécie (CHAÎNEAU *et al.*, 1999). As espécies mais comuns desse gênero incluem: *P.*

chrysogenum, *P. citrinum*, *P. janthinellum*, *P. marneffeii*, *P. purpurogenum*, *P. notatum*, *P. simplicissimum*, *P. funiculosum*, *P. pinophilum*, *P. minioluteum* (GABOARDI, 2007).

1.1.2.1 *Penicillium purpurogenum*

A espécie *P. purpurogenum* pertence ao Filo *Ascomycota*, Classe *Ascomycetes*, Ordem *Eurotiales*, Família *Trichomaceae* e Gênero *Penicillium*. Assim como outros fungos filamentosos, esse micro-organismo tem capacidade de sintetizar uma variedade de substâncias com potencial biotecnológico, entre elas: enzima β -glucosidase (DHAKE; PATIL, 2005), grande número de xilanases (BELANCIC *et al.*, 1995, HIDALGO *et al.*, 1992, EGAÑA *et al.*, 1996, SHALOM *et al.*, 2008), celulases (STEINER *et al.*, 1994, RUEGGER; TAUK-TORNISIELO, 2004), α -L-arabinofuranosidases (FRITZ *et al.*, 2008) α -1,3-glucanase (SHALOM *et al.*, 2008) e substâncias colorantes (MAPARI *et al.*, 2010; MÉNDEZ *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012; VELMURUGAN *et al.*, 2010a).

As colônias de *P. purpurogenum* apresentam, em meio Agar Czapeck e extrato de levedura (CYA), diâmetro variando de 15 a 30 mm, plana ou radial, densa, usualmente aveludada, com micélio amarelo brilhante ou vermelho devido às hifas incrustadas, e reverso da colônia vermelho escuro a roxo, aproximando-se do preto. Colônias em Agar Extrato de Malte (MEA) de 22 a 35 mm de diâmetro, planas, densa, aveludada com micélio de branco a amarelo brilhante e reverso usualmente claro, sendo marrom ou vermelho opaco no centro. Colônias em G25N microscopicamente de 6 mm de diâmetro, coloridas como em CYA, reverso da placa de marrom claro a escuro. Não há germinação na faixa de 5°C a 37°C; as colônias comumente variam entre 12 e 22 mm de diâmetro, usualmente similares às obtidas em CYA a 25°C, ocasionalmente não apresentam pigmentos vermelhos solúveis (PITT, 1985).

Os conidióforos desta espécie nascem a partir da superfície ou do micélio aéreo, apresentando estirpes de 70 a 300 μ m de comprimento, parede lisa, penicílio terminal biverticilado conídio elipsoidal, algumas vezes tornando-se subesferoidal quando maduro, 3,0 a 3,5 μ m de comprimento, com paredes lisas, finamente áspera ou verrugosa. A característica mais impressionante, e até mesmo distintiva, do *Penicillium purpurogenum* é a difusão intensa e rápida

de pigmentação vermelha em meio CYA, tanto a 25 quanto a 37 °C. Em raros casos de ausência de pigmentação, uma característica diferenciada inclui: conídio verde escuro, tanto em CYA quanto em MEA, crescimento moderado a 37 °C, penicílio estreito e parede pesada, variando de elipsoidal a subesferoidal do conídio. As paredes conidiais variam de bastante lisa a áspera. O *habitat* deste fungo é primariamente o solo, contudo são facilmente encontrados em diversos ambientes úmidos (PITT, 1985).

1.1.3 Cultivo submerso

Diversos produtos biológicos utilizados nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia são obtidos por cultivo submerso. O aumento de produtos comercializados, como produtos do metabolismo primário (p.ex. álcool, ácidos orgânicos), metabólitos secundários (exemplo: antibióticos), células, enzimas, entre outros, tem assegurado mudanças significativas no biorreator, como melhor desempenho e segurança de operação (SILVA, 2000).

Existem diversos modos de operação para os cultivos submersos nos quais os micro-organismos estão envolvidos. Na utilização do processo batelada (também denominado descontínuo), todos os nutrientes requeridos durante o cultivo, exceto oxigênio em processos aeróbios ou componentes químicos para ajustes de pH, são adicionados antes do início do cultivo e o produto é retirado somente no término de cada operação. No processo contínuo, os nutrientes são adicionados continuamente, enquanto o meio em cultivo é removido na mesma velocidade de fluxo de alimentação, mantendo o volume constante no interior do biorreator (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Independentemente do modo de operação utilizado, o desenvolvimento de cultivos submersos para produção de metabólitos por micro-organismo, em particular, não tem apenas assegurado suprimento potencialmente ilimitado dessas biomoléculas, como também tornou possível – e, em muitas vezes, viável – o surgimento de novos sistemas enzimáticos (PARK, 1975).

Novos processos economicamente viáveis, com reprodutibilidade e confiabilidade, aumentaram a necessidade de controle e de melhor acompanhamento do processo. Porém, maiores progressos resultariam da melhor compreensão da fisiologia microbiana, interações do micro-organismo

com o meio e sua habilidade em manipular fluxos metabólicos (BUCKLAND, 1993).

Segundo Taciro (1992), a ampliação de escala de um cultivo submerso, para posterior aplicação industrial, implica em manter uniformes as diversas condições do processo (temperatura, pH, concentração de oxigênio, pressão, concentração de nutrientes e tensão de cisalhamento), independentemente do volume do biorreator.

No entanto, de acordo com Tong e Inloes (1990), para tornar viável essa ampliação de escala, é indispensável primeiro definir o micro-organismo a ser empregado, o meio de cultivo e as condições de agitação e aeração mais adequadas ao processo.

1.1.3.1 Agitação e aeração em cultivos submersos

A agitação, bem como a aeração, é de fundamental importância, principalmente quando se trata de cultivos aeróbios. No metabolismo celular, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons na cadeia respiratória, sendo então reduzido à água, garantindo, deste modo, a reoxidação das moléculas transportadoras de elétrons e proporcionando a geração de energia sob a forma de moléculas de ATP (LEHNINGER, 1976).

O oxigênio deve, portanto, ser considerado um nutriente semelhante a outros dissolvidos no caldo de cultivo, uma vez que existe a necessidade de manter níveis de oxigênio dissolvido no meio que garantam o perfeito funcionamento da cadeia de transporte de elétrons. Contudo, a solubilidade do oxigênio é extremamente baixa quando comparado com a de outros nutrientes, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Solubilidade de alguns compostos em água à temperatura igual a 30°C FONTE: Bailey e Ollis (1986).

Composto	Solubilidade em água a 30°C
Oxigênio (puro)	0,0371 g/L
Oxigênio (ar)	0,0077 g/L
Na₂HPO₄·12H₂O	208,0 g/L
NaCl	363,0 g/L
(NH₄)₂SO₄	780,0 g/L
Glicose	820,0 g/L

Diversos autores afirmam que os objetivos principais das condições de agitação e aeração em tais cultivos são, primeiramente, a dispersão das bolhas de ar, com o conseqüente suprimento de oxigênio aos micro-organismos, a fim de viabilizar suas atividades metabólicas. A segunda função é manter os micro-organismos em suspensão, obtendo-se, assim, a boa mistura do meio e a dispersão das células, visando melhorar os processos de transferência de quantidade de movimento, calor e massa no sistema (LEE, 1992).

Segundo Sikyta (1983), a principal dificuldade encontrada com relação à agitação e à aeração em culturas submersas é a aplicação de níveis ótimos destas condições.

1.1.4 Processos de separação e purificação de bioprodutos

Os tradicionais métodos de extração de colorantes apresentam muitos inconvenientes, tais como longo tempo do processo, baixa seletividade e eficiência de extração (BORGES *et al.*, 2012). Além disso, as técnicas convencionais usam grande quantidade de solvente orgânico e múltiplos passos cromatográficos, os quais elevam significativamente o custo do processo. Além disso, o uso de solventes orgânicos apresenta algumas limitações para aplicação em larga escala, devido à toxicidade dos solventes, seu custo, seu impacto ambiental e ao fato que solventes orgânicos podem levar à degradação dos metabólitos. Já as técnicas cromatográficas são relativamente caras (DERMIKI *et al.*, 2009). Assim, o desenvolvimento e o aprimoramento de novas tecnologias de purificação são de grande interesse.

Neste contexto, nos últimos anos, vêm-se ampliando a utilização dos métodos de extração líquido-líquido em sistemas aquosos, com a finalidade de extrair moléculas, sejam elas biologicamente ativas ou não. A extração líquido-líquido, de forma geral, consiste em um processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para outra fase líquida imiscível em contato com a primeira. Para tanto, se propõe a adição de polímeros hidrofílicos, que formam os chamados Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA), ou surfactantes não iônicos, às soluções aquosas, levando ao estabelecimento de duas fases aquosas imiscíveis (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003). Nestes processos, o conhecimento das relações de equilíbrio de fases, que são

baseadas em princípios termodinâmicos, é fundamental para análises quantitativas das extrações.

Os SPDFA resultam da incompatibilidade, em soluções, de dois polímeros (por exemplo, PEG e dextrana) ou entre um polímero e um sal apropriado (por exemplo: fosfato ou citrato) que ocorrem em função da concentração destes compostos. A alta concentração de água (aproximadamente 65-90%) em tais sistemas favorece a estabilidade de moléculas biologicamente ativas durante a separação, quando comparado com sistemas de duas fases em solvente orgânico.

1.1.4.1 Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)

Os sistemas de duas fases aquosas foram estudados pela primeira vez no final do século XIX, quando Beijernick descobriu que uma mistura de gelatina e ágar podia formar um sistema de duas fases, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior em Agar (ALBERTSSON, 1986). Mais tarde, nos anos 1950, Albertsson e a sua equipe voltaram ao estudo dos SDFA, investigando sistemas de polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água, bem como sistemas com o PEG, dextrana e água (ALBERTSSON, 1986). Desde então, vários pesquisadores basearam o seu trabalho no estudo e na aplicabilidade dos SDFA.

Os sistemas mais estudados nas últimas décadas são os sistemas PEG/dextrana e PEG/sal, sendo igualmente os mais utilizados para a purificação de grande número de biomoléculas (OLIVEIRA *et al.*, 2001). As fases são designadas “aquosas” devido à sua elevada composição em água (de 85 a 99%), permitindo, dessa forma, uma partição de biomoléculas e de partículas celulares em condições não desnaturantes. As composições das fases de equilíbrio podem ser alteradas por manipulação de diversos fatores, como temperatura, tipos e massa molecular dos polímeros e adição de sais ao sistema (PORTO *et al.*, 2008).

Entre as diversas vantagens que têm contribuído para o crescente interesse nos SDFA, destacam-se: a facilidade de aumento de escala (passagem de escala piloto para escala industrial); a capacidade de oferecer bons fatores de resolução e elevados rendimentos em atividades (rápida transferência de massa, pouco gasto de energia na forma de mistura mecânica

para atingir o equilíbrio); o fato de proporcionar ambientes suaves para o tratamento de materiais biológicos (possibilidade de operação à temperatura ambiente); e a possibilidade de operação rápida e seletiva (ALBERTSSON, 1986). Esses sistemas possuem elevado potencial para a separação eficiente e de baixo custo, especialmente de proteínas (que podem ser difíceis de separar em grande escala). São vantajosos na extração de pequenos materiais particulados (extração direta do meio fermentado) e na obtenção de grandes volumes em modos de operação contínuos (tempo de contato curto) (PORTO *et al.*, 2008).

O desenvolvimento das extrações utilizando SPDFA em grandes escalas está muito limitado aos sistemas de PEG-dextrana e PEG-sal. Estes sistemas apresentam propriedades físicas muito favoráveis, referentes especialmente à viscosidade e à diferença de densidade entre as fases. As escolhas desses processos de produção são fortemente influenciadas por questões legais, isto porque têm que obedecer a parâmetros toxico-ambientais e, neste caso, tanto o PEG como a dextrana são atóxicos e não causam distúrbios ambientais (SARMENTO *et al.*, 1994).

Contudo, a extração líquido-líquido, utilizando sistemas aquosos bifásicos, apresenta, como desvantagem, o elevado custo dos polímeros tradicionalmente utilizados na separação de fases, o que se coloca com um grande entrave ao recurso desta técnica. Dessa forma, vários grupos de pesquisa procuram desenvolver sistemas que reciclem os polímeros ou os substituam por polímeros de baixo custo (JOHANSSON *et al.*, 2008a). Outro aspecto importante é que, para produtos que exigem elevado grau de pureza, a extração em SPDFA não é suficiente e, nesses casos, será sucedida por uma ou mais etapas cromatográficas. Desse modo, o sistema de duas fases aquosas é considerado como uma etapa de purificação parcial (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005).

1.1.4.1.1 Diagrama de fase

Para a utilização de SDFa é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Dessa forma, são construídos os diagramas de fases para os componentes, nos quais se determina as composições dos componentes para a separação das fases. Na mistura do

polímero ou dos sais com a água, apenas irá ocorrer um sistema de duas fases quando a composição dos componentes se encontrar acima de determinados valores (PEREIRA, 2005). A Figura 3 apresenta genericamente um diagrama de fases constituído por dois polímeros ou um polímero e um sal.

No diagrama de fases, a linha convexa que separa a região de uma fase, na qual os componentes se misturam (ponto A), e a região de duas fases, na qual os componentes se tornam imiscíveis (ponto B), denomina-se Curva Binodal. As outras linhas que aparecem no diagrama de fases são as linhas de amarração, que representam as várias composições totais do sistema (B) e nas quais as extremidades (nodos) representam, respectivamente, as composições das fases superiores e inferiores (B' e B'') (PEREIRA, 2005).

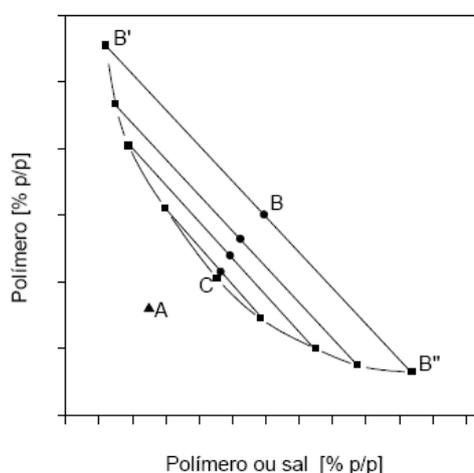


Figura 3. Diagrama de fases para um sistema de duas fases aquosas. Binodal (-□-), linha de ligação (-●-), região de uma fase (A), região de duas fases e composição total do sistema (B), sendo B' e B'' as composições das fases superior e inferior do sistema e ponto crítico (C)
 FONTE: Pereira (2005).

1.1.4.1.2 Sistema Polimérico Polietileno glicol-Poliacrilato de Sódio

O Sistema Polimérico Polietileno glicol-Poliacrilato de Sódio (PEG/NaPA) apresenta-se como um novo e barato sistema de duas fases aquosas. Os bem conhecidos sistemas PEG/sal são relativamente baratos, contudo são menos amenos que os sistemas polímero-polímero [suavidade do sistema ligado ao elevado teor em água das fases (> 85%)]. Desde 2000, as propriedades de fase (por exemplo, o efeito da adição e o tipo de sal na curva binodal) desse novo sistema vêm sendo estudadas, sendo verificado que os sistemas poderiam ser formados com o mínimo de 3% (p/p) de polímero usando PEG

6.000 g/mol/NaPA 25.000 g/mol (GUPTA *et al.*, 2002). Em 2006, Saravanan e colaboradores determinaram as curvas binodais para o sistema PEG 6.000 g/mol/NaPA 2.100 g/mol, usando concentração mínima total de polímero de 25% (p/p) e particionado sem adição de sal (SARAVANAN *et al.*, 2006).

O sistema PEG/NaPA forma duas fases somente em determinadas condições, como na necessidade das moléculas de NaPA estarem totalmente dissociadas ($\text{pH} > 7$) (JOHANSSON *et al.*, 2008b). Além disso, é necessária quantidade suficiente de sal no sistema, de forma a facilitar a compartimentalização do polieletrólito (NaPA) altamente carregado em uma das fases. Essas razões, em contraste com a sua simplicidade química, levaram Johansson e colaboradores (2008a) a considerarem esse novo sistema na área de partição de biomoléculas. De modo geral, este sistema apresenta algumas vantagens: baixa viscosidade; fases claras bem definidas; possibilidade de reciclagem.

Os dois polímeros podem ser separados de uma solução, fazendo pequenas alterações nas condições experimentais. No caso do PEG, deve-se efetuar alterações na temperatura; no caso do NaPA, altera-se o pH (JOHANSSON, *et al.*, 2008 a,b). O aquecimento de uma solução aquosa de PEG acima da sua temperatura crítica inferior de solução (LCST- *low critical solution temperature*) (aproximadamente 100°C para PEG de alta massa molecular) (JOHANSSON *et al.*, 2008a) torna-a turva. No diagrama de fases, a fronteira entre regiões de uma fase e duas fases é dada por esse ponto de turbidez. No caso do polímero NaPA, este se dissocia em pH acima de 5,0 - e encontra-se totalmente carregado em pH 7,0. Para pH abaixo de 5,0, o NaPA está neutro e precipita em solução aquosa. Portanto, o ajuste do pH possibilita a modulação da solubilidade deste polímero (JOHANSSON *et al.*, 2008b).

O PEG também pode ser reciclado através de *salting-out*, esse efeito acontece quando a concentração de sal atinge valores elevados, resultando em aprisionamento das moléculas de água para a solvatação dos íons; assim, as moléculas de água ordenadas em torno das regiões hidrofóbicas da proteína se tornam escassas, ficando expostas e podendo interagir e se agregar entre si (LOPES, 2006). Para ocorrer o *salting-out*, adiciona-se sal à fase rica em PEG, induzindo um (JOHANSSON *et al.*, 2008a) sistema de duas fases PEG/sal (JOHANSSON *et al.*, 2008b).

A cadeia principal do NaPA é hidrofóbica (JOHANSSON *et al.*, 2008b) e sua solubilidade é caracterizada pela presença de grupos carboxílicos (ânions) nos grupos poliméricos laterais. Estes grupos, quando carregados (pH > 5,0), são fortemente hidrofílicos e, por isso, PEG e NaPA separam-se em duas fases diferentes (JOHANSSON *et al.*, 2008b).

O PEG é um polímero não carregado, enquanto que o NaPA é um polímero com forte carga negativa (pH > 5,0); assim, para haver separação no intervalo de concentração útil de polímero 1-10% (p/p), é necessária uma concentração mínima de sal, devido à penalização da entropia mediante a condensação dos contra íons. Uma vez que o NaPA é fortemente carregado negativamente, terá interação repulsiva com biomoléculas com carga negativa. Johansson e seus colaboradores, em estudos sobre a partição da hemoglobina em sistemas PEG/NaPA, verificaram que ocorre muita precipitação no sistema quando a hemoglobina encontra-se carregada positiva ou fracamente negativa (JOHANSSON *et al.*, 2008b).

Diversas variáveis podem influenciar a formação e a partição de um soluto nos SPDFA (em termos numéricos, é quantificado pelo coeficiente de partição, K). As variáveis incluem características dos polímeros que formam as fases (tipo, massa molecular e concentração), características dos aditivos (tipo e concentração), pH, temperatura, características do soluto, entre outros (ZASLAVSKY, 1995). A aplicação biotecnológica dos SPDFA é influenciada pela habilidade de desenvolver modelos e correlações que permitam compreender como ocorre a interação entre as propriedades físico-químicas das biomoléculas e das fases dos polímeros e/ou dos sais na partição nestes sistemas (OLIVERA-NAPPA *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, o interesse por SPDFA tem aumentado devido a sua aplicação na separação e na purificação de diferentes tipos de biomoléculas, tais como: ascorbato oxidase (PORTO *et al.*, 2008), ricina B (ZHANG *et al.*, 2005), xilose redutase (MAYERHOFF *et al.*, 2004), fosfolipase D (TEOTIA; GUPTA, 2004); purificação de colorantes: betalaína (CHETHANA *et al.*, 2007), ficoeritrina B (RITO-PALOMARES, 2004), luteína (CISNEROS *et al.*, 2004), policetideos (ESMANHOTO; KILIKIAN, 2004), ácido clavulânico (PEREIRA *et al.*, 2012), toxina alfa (CAVALCANTI *et al.*, 2008), entre outras biomoléculas.

1.1.4.2 Colloidal Gas Aphrons (CGA)

1.1.4.2.1 Surfactantes

Os surfactantes são compostos que diminuem a tensão interfacial por sua adsorção a superfícies. Esta propriedade é principalmente devido a estas moléculas serem anfifílicas, compostas de uma porção hidrofílica ou polar, comumente denominada “cabeça polar”, e uma porção hidrofóbica ou apolar, comumente denominada “cauda apolar”. Dependendo da natureza química do grupamento da cabeça polar, os tensoativos podem ser classificados em iônicos (catiônicos ou aniônicos), não iônicos (cabeça polar capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água) e zwitteriônicos (cabeça caracterizada por um dipolo) (ISRAELACHVILI, 1992). Dodecil sulfato de sódio (SDS), Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) e Tween 20 são exemplos de surfactantes aniônico, catiônico e não iônico, respectivamente (Figura 4).

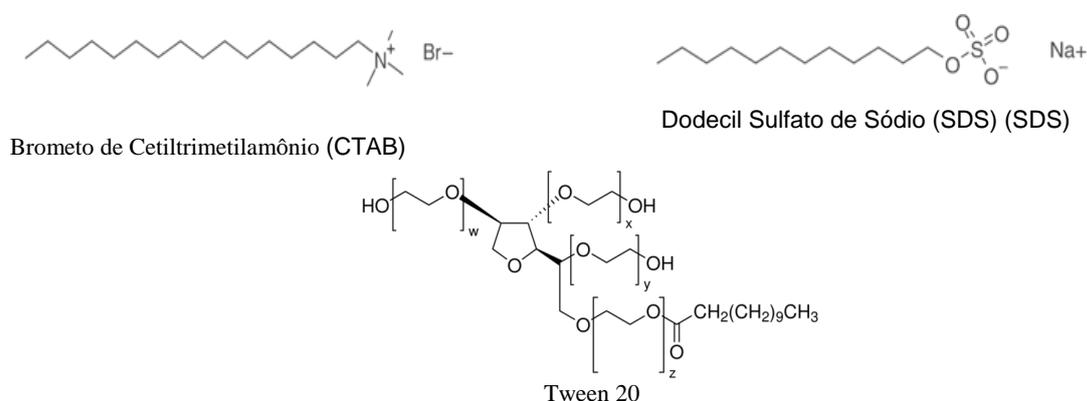


Figura 4. Estrutura química dos surfactantes Dodecil sulfato de sódio (SDS), Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) e Tween 20.

Os surfactantes em solução aquosa podem exibir diversos tipos de comportamento, dependendo da sua concentração. Em soluções contendo o tensoativo em concentração abaixo da concentração micelar crítica (CMC), específica para cada surfactante, as moléculas adsorvem na interface ar-água, projetando suas caudas apolares em direção à fase ar, de forma a minimizar o contato com a água, e, portanto, diminuindo a tensão existente nesta interface. Entretanto, a maioria dos surfactantes apresenta solubilidade mínima na fase aquosa, caracterizada pelo caráter hidrofóbico da cauda apolar. Desta forma, em soluções com concentrações de tensoativo superiores à CMC, as moléculas de tensoativo formam agregados conhecidos como micelas, nas quais as caudas hidrofóbicas se associam no interior, minimizando o contato

com a água, de modo que as cabeças polares permanecem na periferia da micela, maximizando seu contato com a água (CHEVALIER; ZEMB, 1990; TANFORD, 1980). Desta maneira, a adsorção de um surfactante a partir de uma solução em uma superfície depende da concentração do mesmo em solução.

As micelas são termodinamicamente estáveis e facilmente reprodutíveis, são destruídas pela diluição com água quando a concentração do surfactante fica abaixo da CMC. Uma propriedade importante das micelas é o seu poder de solubilizar os mais variados solutos ou espécies pouco solúveis. A quantidade de soluto solubilizada é, em geral, diretamente proporcional à concentração do surfactante, desde que a concentração do surfactante seja igual ou superior a CMC e desde que existam várias possibilidades de solubilização no sistema micelar. Estes efeitos são consequência da solubilização dos reagentes na micela, sendo estes atribuídos ao balanço das interações de hidrofobicidade e eletrostática ocorrendo entre os reagentes e o sistema micelar (MANIASSO, 2001).

1.1.4.2.2 Estrutura das *Colloidal Gas Aphrons* (CGA)

CGA são microbolhas de surfactantes estabilizadas (10-100 μm de diâmetro), formadas pela agitação de uma solução de surfactante a alta velocidade (> 8.000 rpm) (JAUREGI; DERMIKI, 2010). A intensa agitação da solução surfactante causa o aprisionamento do ar e a formação das microbolhas. O termo coloidal foi utilizado devido ao pequeno tamanho das bolhas, embora as dimensões não estejam verdadeiramente na faixa coloidal, que é aproximadamente 1 nm - 1 μm (JAUREGI; VARLEY 1999).

A estrutura de CGA foi primeiramente proposta por Sebba (1987), que postulou que, diferentemente, das bolhas convencionais, que possuem ao seu redor uma monocamada de surfactante, os CGA são formados por múltiplas camadas de moléculas de surfactantes, como apresentado na Figura 5. As moléculas de surfactantes adsorvem na interface com cabeças hidrofílicas através da solução aquosa e a cauda hidrofóbica através da fase gasosa. A hipótese da estrutura proposta por Sebba foi baseada em uma série de observações experimentais, como a coalescência e a maior estabilidade da CGA quando comparado a bolhas convencionais. Os CGA podem durar por

minutos ou horas, se for mantida a agitação, sem coalescência considerável. De acordo com o autor, este é o resultado de uma multicamada de filme surfactante ao redor da bolha de gás, a qual retarda a coalescência.

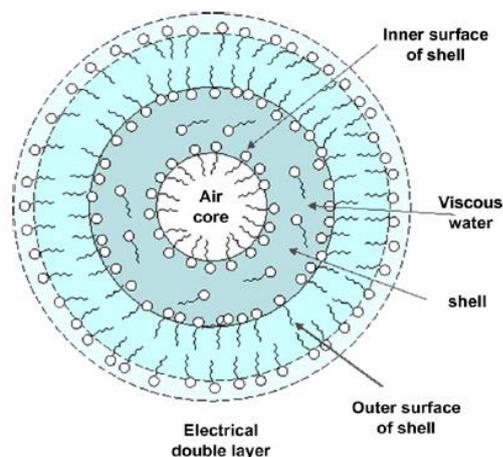


Figura 5. Estrutura proposta por SEBBA (1987).

Os CGA possuem propriedades únicas, que fazem deles uma alternativa atrativa para os processos de biosseparação:

- Grande área interfacial, devido ao seu reduzido tamanho, o que aumenta a adsorção das moléculas (DERMIKI *et al.*, 2010)
- Alta estabilidade quando comparada a bolhas convencionais, devido a sua estrutura multicamada
- Propriedades de fluxo similares às da água, o que reduz o número de operações para purificação/recuperação do produto, gera baixa viscosidade no sistema, de modo que os CGA podem ser bombeadas facilmente e sem significativa coalescência das bolhas, em contraste com as bolhas convencionais, cujas características mudam durante o bombeamento devido a natureza elástica das bolhas (DERMIKI *et al.*, 2010)
- Apresentam vantagens significativas quanto ao custo, quando comparadas a métodos cromatográficos e por membranas (FUDA *et al.*, 2004; JAUREGI, 1999)
- A fluutuabilidade dos gases encapsulados permite a fácil separação da fase *aphron* a partir da fase líquida, não sendo necessário centrifugar para separar as duas fases (JAUREGI; DERMIKI, 2010)
- Requerem baixa energia e podem ser utilizados para tratar materiais degradados (DERMIKI *et al.*, 2009)

Dependendo do surfactante utilizado para gerar os CGA, a superfície exterior da microbolha pode estar positivamente, negativamente ou não carregada, o que resulta na adsorção de moléculas de cargas opostas ou não-carregadas, acarretando na separação seletiva de biomoléculas do meio líquido (SPIGNO; JAUREGI, 2005).

Além disto, o uso de surfactantes biodegradáveis poderia resultar em processos ambientalmente amigáveis, enquanto que o produto final poderia também ser seguro para consumo humano – e em alguns casos estes surfactantes podem até mesmo aumentar a validade de moléculas lipofílicas, por exemplo, o uso do surfactante Tween 20 pode aumentar a bioviabilidade da astaxantina (DERMIKI *et al.*, 2008).

1.1.4.2.3 Estabilidade e caracterização de CGA

As interações eletrostáticas (no caso de surfactantes iônicos) e as forças de superfície contribuem para a estabilidade das dispersões CGA. Grupos polares ou carregados nas moléculas de surfactante na interface gás-líquido de *aphrons* adjacentes se repelirão e retardará a coalescência dos *aphrons*. Como as interações eletrostáticas não são a principal força de estabilização quando os CGA são geradas a partir de surfactantes não iônicos, outras forças (por exemplo, forças estéricas) devem ter papel na estabilização destas dispersões.

A estabilidade dos CGA é medida em termos do tempo para o seu colapso. Em muitos estudos, a estabilidade tem sido descrita em termos de meia-vida. O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para a metade do volume inicial do líquido ser drenada após a agitação ter sido interrompida (JAUREGI; VARLEY, 1999; JAUREGI *et al.*, 1997).

Vários parâmetros operacionais exercem efeito sobre a estabilidade dos CGA, variando da concentração de surfactante à velocidade de agitação. Matsushita *et al.* (1992) encontraram dispersões mais estáveis com surfactantes iônicos em comparação aos não iônicos. Save e Pangarkar (1994) estudaram diferentes surfactantes iônicos e concluíram que a estabilidade aumenta com o comprimento da cadeia alquila.

A caracterização dos CGA é feita pelo *gas hold-up* e pela sua estabilidade. *Gas hold-up* é definido como a razão do volume de gás na dispersão pelo volume total da dispersão (JAUREGI *et al.*, 1997). É desejável

ter alto *gas hold-up*, pois a área superficial do sistema geralmente será maior quanto maior o valor deste parâmetro, assumindo-se que o diâmetro da bolha seja constante. E, ainda, para altos valores de *gas hold-up*, o volume da fase *aphron* colapsada será menor, devido ao alto conteúdo de gás; portanto, o enriquecimento desta fase será maior (NOBLE *et al.*, 1998).

O aumento da concentração do surfactante aumenta a estabilidade da dispersão dos CGA. Isto acontece provavelmente devido ao aumento nas forças repulsivas entre as moléculas de surfactante ou na superfície surfactante ou na solução *bulk* – e pode também ser devido à formação de camadas múltiplas de surfactante ao redor das *aphrons* (SEBBA, 1987).

Vários usos de CGA têm sido descritos: recuperação de proteínas (FUDA *et al.*, 2004, 2005; JARUDILOKKUL *et al.*, 2004; JAUREGI *et al.*, 1997; NOBLE *et al.*, 1998), ácido gálico (SPIGNO *et al.*, 2010; SPIGNO; JAUREGI, 2005), norbixina (ALVES *et al.*, 2006), astaxantina (DERMIKI *et al.*, 2008, 2009, 2010); remoção de resíduos tóxicos de óleos em solos (ROY *et al.*, 1995); recuperação de fibras de celulose a partir de águas residuais da indústria de papel (HASHIM *et al.*, 2000); remoção de gotículas de óleo dispersas em água (DAÍ; DENG, 2003); remoção de metais pesados; flotação de algas unicelulares; clarificação de suspensões; remoção de cristais de enxofre; separação de corantes orgânicos de águas residuais; tratamento de resíduos; extração aquosa bifásica de uma enzima e remoção de pentaclorofenol de soluções aquosas (JAUREGI *et al.*, 1997).

2. CAPÍTULO II

Submerged culture conditions for the production of alternative natural colorants by a new isolated *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275

Valéria Carvalho Santos-Ebinuma, Maria Francisca Simas Teixeira,
Adalberto Pessoa Jr.

Este artigo foi submetido ao periódico *Journal of Microbiology and Biotechnology*, com fator de impacto igual a 1,38. Submissão em 20-Novembro-2012.

Condições do cultivo submerso para a produção de colorantes naturais alternativos por um novo isolado *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275

2.1 Resumo

Há grande interesse no desenvolvimento de projetos de pesquisa envolvendo a produção de colorantes naturais, devido a sérios problemas de segurança associados ao uso industrial de colorantes sintéticos. Neste contexto, microorganismos têm surgido como uma fonte alternativa para estes metabólitos. O objetivo deste trabalho é investigar a produção de colorantes naturais amarelos, laranjas e vermelhos por cultivo submerso de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. Para tanto, a cinética de crescimento foi obtida com 10^8 esporos/mL e 5 discos de micélio durante 360 horas. Os resultados demonstraram que 5 discos de micélio e 336 horas de cultivo promoveram a maior produção de colorantes amarelos (2,06 UA_{400nm}), laranjas (1,32 UA_{470nm}) e vermelhos (1,05 UA_{490nm}). Além disso, diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram avaliadas em relação à produção dos referidos colorantes. Sacarose e extrato de levedura mostraram serem as fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, mais favoráveis para a produção dos colorantes. Desta maneira, o presente trabalho mostra uma nova fonte de colorantes naturais, os quais podem ser utilizados como alternativa aos disponíveis no mercado depois de considerável estudo toxicológico.

Palavras-chave: colorantes naturais, fungos filamentosos, cultivo submerso, produção.

2.2 Introdução

Colorantes naturais e sintéticos têm sido extensivamente utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (HAILEI *et al.*, 2011). Todavia, colorantes naturais têm recentemente ganhado popularidade em relação aos colorantes sintéticos, os quais são potencialmente carcinogênicos (KONGRUANG, 2011). Desta maneira, há demanda crescente por colorantes não tóxicos e/ou *eco-friendly*, especialmente para aplicação na área de saúde, como coloração de alimentos, brinquedos infantis e elementos de couro (VELMURUGAN *et al.*, 2010a).

Colorantes naturais podem ser obtidos a partir de plantas (BOO *et al.*, 2012; DEVEOGLU *et al.*, 2012), insetos (MARCO; GÄDE, 2010; UNAGUL *et al.*, 2005) e micro-organismos (CHO *et al.*, 2002a; VELMURUGAN *et al.*, 2010a); os últimos apresentam a vantagem de versatilidade e maior produtividade quando comparados a outras fontes de colorantes naturais disponíveis em escala de produção industrial. Ademais, os colorantes microbianos têm duas principais vantagens sobre os colorantes artificiais e inorgânicos: a primeira é o processo fermentativo, que é inerentemente o mais rápido e produtivo método de produção, quando comparado a outros processos químicos. A outra vantagem dos micro-organismos é que seu crescimento é relativamente alto e a manipulação dos seus genes é fácil (VELMURUGAN *et al.*, 2010b).

Dentre os micro-organismos, a produção de colorantes por fungo está em ascensão. A diversidade dos colorantes fúngicos não está relacionada somente às suas estruturas químicas, mas também à faixa de cores que estes colorantes podem alcançar (MAPARI *et al.*, 2009). Colorantes fúngicos são produzidos como metabólitos secundários de função conhecida ou não. Colorantes policetídeos comercialmente disponíveis de *Monascus* têm sido usados como colorantes alimentícios por centenas de anos no Oriente. Todavia, espécies de *Monascus* também são reportados como co-produtores da micotoxina citrinina e outros potenciais metabólitos tóxicos (MAPARI *et al.*, 2010). Desta maneira, há interesse por organismos alternativos produtores de colorantes (HAILEI *et al.*, 2011).

Recentemente, cepas de *Penicillium* vêm sendo reportadas como potenciais produtores de colorantes, para serem aplicados na indústria

alimentícia, devido a sua característica de não produzir citrinina. Os colorantes produzidos por estes micro-organismos são homólogos aos colorantes de *Monascus* com cromóforos similares (MAPARI *et al.*, 2008). Méndez *et al.* (2011) mencionam que *Penicillium purpurogenum* pode produzir colorantes tanto em meio sólido quanto em meio líquido. Além disso, em estudos conduzidos por Teixeira *et al.* (2011), *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 mostrou potencial para produzir colorantes naturais com significativa atividade antimicrobiana e total ausência de toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina*.

Estudos para otimizar a produção e as características do micro-organismo durante o processo são necessários. Diversos trabalhos têm indicado que a produção de colorantes por cultivo submerso é afetada por diferentes fatores ambientais (WANG *et al.*, 2005), tai. Além disso, encontrar fontes de carbono e nitrogênio adequadas é importante, pois estes afetam o crescimento celular e o desenvolvimento de produtos por micro-organismos (WANG *et al.*, 2005). É de conhecimento que cultura de fungos em meio líquido requer carboidratos (como fonte de carbono), nitrogênio, zinco e sulfato de magnésio (DUFOSSÉ *et al.*, 2005).

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de colorantes extracelulares amarelos, laranjas e vermelhos por cultivo submerso em agitador metabólico por *P. purpurgenum* DPUA 1275. Para tanto, inicialmente, os seguintes parâmetros foram avaliados: tamanho do inóculo, metodologia de inoculação e influência do tempo do bioprocesso. A segunda parte do trabalho foi avaliar diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção dos colorantes.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Reagentes

Sacarose e extrato de levedura foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brazil) e da Acumedia (Lansing, Michigan, USA), respectivamente. Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

2.3.2 Reativação do micro-organismo e autenticação

A cepa de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 foi cedida pela Coleção de Culturas DPUA, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, AM, Brasil. A cultura estoque preservada em água destilada esterilizada foi reativada em meio de cultura Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA) a 25°C, por sete dias. A partir da cultura reativada, um esporo foi transferido para o meio Ágar-água (1,8 %p/v) a 25°C, por sete dias, para produzir a cultura monospórica.

A autenticação da espécie foi realizada pela transferência de um esporo da cultura monospórica para o meio Ágar sabouraud (SAB). A autenticação do *P. purpurogenum* foi realizada através das características morfológicas, usando a chave de identificação proposta por Pitt (1985); Rapper e Fennel (1977) e Samson *et al.* (1988). Depois da autenticação, um esporo da cultura monospórica foi transferido para tubos contendo meio CYA e mantido a 25°C, por sete dias. Para a manutenção das culturas de *P. purpurogenum*, estas foram cultivadas em tubos inclinados contendo meio CYA, incubados a 25°C, por sete dias, e conservados em geladeira a 4°C, sendo repicados a cada 30 dias.

2.3.3 Composição do meio

O meio CYA foi usado tanto como meio de inoculação quanto meio de produção nos experimentos iniciais. Para o estudo da melhor fonte de carbono e nitrogênio, o meio CYA foi considerado o meio padrão. As fontes de carbono avaliadas foram: sacarose, glicose, maltose, amido solúvel e controle (sem suplementação de nutrientes). Para este estudo, extrato de levedura foi utilizado como fonte de nitrogênio.

As fontes de nitrogênio avaliadas foram: extrato de levedura, extrato de malte, sulfato de amônio, peptona, triptona e controle (sem suplementação de nutrientes). Sacarose foi utilizada como fonte principal de carbono. A relação carbono:nitrogênio (C:N) foi mantida em 15 em todas as condições, excluindo a condição controle, que teve uma relação C:N de 28. Todos os meios foram autoclavados a 121°C, por 15 minutos.

2.3.4 Condições do cultivo submerso

Para o primeiro conjunto de experimentos, as duas metodologias de inoculação (suspensão de esporos e discos de micélio) e a influência do tempo de incubação e do tamanho do inóculo foram avaliadas na produção de colorantes naturais extracelulares por *P. purpurogenum*. Para a metodologia de suspensão de esporos, o micro-organismo cresceu em tubos de ensaios contendo o meio CYA, por sete dias, a 25°C. Depois do período de incubação, os esporos foram raspados com auxílio de espátula e a concentração de esporo ajustada para 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos/mL, com auxílio de Câmara de Neubauer (MANACHINI *et al.*, 1987), e transferidos para frascos Erlenmeyer.

Para a metodologia de discos de micélio, a partir de uma cultura estoque, crescida em meio CYA, em placa de Petri, durante 7 dias, a 25°C, 5, 10 ou 15 discos de micélio (8 mm de diâmetro) foram retirados da margem da colônia e transferidos para frascos Erlenmeyer. Ambos os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL de meio de cultivo CYA líquido (pH 6,5) em agitador de bancada a 30°C/150 rpm. Amostras foram removidas após 120, 216 e 288 horas, para se determinar a produção de colorantes, pH e biomassa.

A cinética de crescimento foi determinada para ambas as metodologias. Todavia, o tamanho do inóculo avaliado foi de 5 discos de micélio e 10^8 esporos/mL. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições descritas acima, durante 360 horas, e amostras foram retiradas a cada 24 horas.

A segunda parte do trabalho, que avaliou as melhores fontes de carbono e nitrogênio, foi realizada com 5 discos de micélio de *P. purpurogenum* em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL de meio de cultivo CYA líquido, sob as seguintes condições: 150 rpm/30°C/336 horas.

2.3.5 Métodos analíticos

O meio fermentado foi filtrado em papel de filtro Whatman n°1 (Whatman, England) e em filtro Millipore 0,45 μm . A partir do filtrado, determinou-se a produção de colorantes, pH e consumo de sacarose. A concentração de biomassa fúngica foi determinada por peso seco e, a partir desta, construiu-se a curva de crescimento do micro-organismo. A

concentração de sacarose foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Dubois et al. (1956) e o pH medido em pHmetro.

A produção de colorantes extracelulares foi estimada através da medida da absorbância dos filtrados em aparelho espectrofotômetro e considerando o fator de diluição de cada amostra. O comprimento de onda de cada colorante foi varrido na faixa de 350 a 600 nm. A leitura do sobrenadante atingiu picos a 400, 470 e 490 nm, que correspondem à máxima absorbância para os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, respectivamente. Os resultados foram expressos em termos de Unidades de Absorbância (UA). A máxima absorção obtida para cada colorante está de acordo com os resultados reportados por Johns e Stuart (1991).

2.3.6 Parâmetros calculados

A partir dos dados obtidos, foram determinados o fator de conversão de substrato (sacarose) a células ($Y_{X/S}$), a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), o fator de conversão de célula em produto ($Y_{P/X}$) e a produção específica obtida na máxima absorbância de cada colorante (P_e), de acordo com as equações:

$$Y_{X/S} = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{S_0 - S_f} \quad \text{equação 1}$$

$$\ln(X^*) = \ln(X_0) + \mu_{m\acute{a}x} \times t \quad \text{equação 2}$$

$$Y_{P/S} = \frac{Abs_{m\acute{a}x} - Abs_0}{S_0 - S_f} \quad \text{equação 3}$$

$$P_e = \frac{Abs_{m\acute{a}x}}{X_{m\acute{a}x}} \quad \text{equação 4}$$

em que: $X_{m\acute{a}x}$ é a concentração de celular máxima (g/L); X_0 é a concentração celular inicial; X^* é a concentração celular ao longo da fase exponencial; S_0 e S_f é a concentração inicial e final de substrato (sacarose); $Abs_{m\acute{a}x}$ e Abs_0 é a absorbância máxima e inicial dos colorantes; t: tempo (h)

2.3.7 Análise estatística

Todas as análises e os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média dos valores.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Cultivo monospórico e autenticação do *P. purpurogenum* DPUA 1275

A cultura monospórica permite trabalhar com uma cepa fúngica, já que esta técnica possibilita a diminuição das variações do micro-organismo ao nível morfofisiológico, bioquímico e genético, ao mesmo ser submetido a cultivos sucessivos (GAMS, 1975). Como o método tradicional e comumente usado para identificar espécie de *Penicillium* ainda é a visualização das características morfológicas da colônia (textura, cor, diâmetro da colônia), em um específico meio, e as estruturas reprodutivas (tipos e tamanhos do conídio e conidióforo) (PITT, 1985; TEIXEIRA *et al.*, 2011), este método foi utilizado nas análises.

P. purpurogenum DPUA 1275 mostrou características fenotípicas similares às descritas por Pitt (1985). A partir da colônia macroscópica obtida para os meios Ágar-água, CYA e YES, foram observadas não somente a cor, mas também a textura do micélio em cada um destes meios (Figura 6). No meio CYA, observou-se a difusão de colorantes de cor avermelhada, indicando a produção de colorantes pelo micro-organismo. Neste meio, também se mediou o diâmetro da colônia (29 mm) e o valor obtido estava dentro do esperado para o meio CYA, de acordo com o valor citado na literatura (PITT, 1985). No meio Ágar-água, a coloração obtida tanto na superfície da colônia quanto no seu verso foi esverdeada, sem produção de colorantes visíveis, como no meio CYA. Este resultado já era esperado, pois neste meio não havia os nutrientes necessários para estimular a produção destes metabólitos pelo micro-organismo.

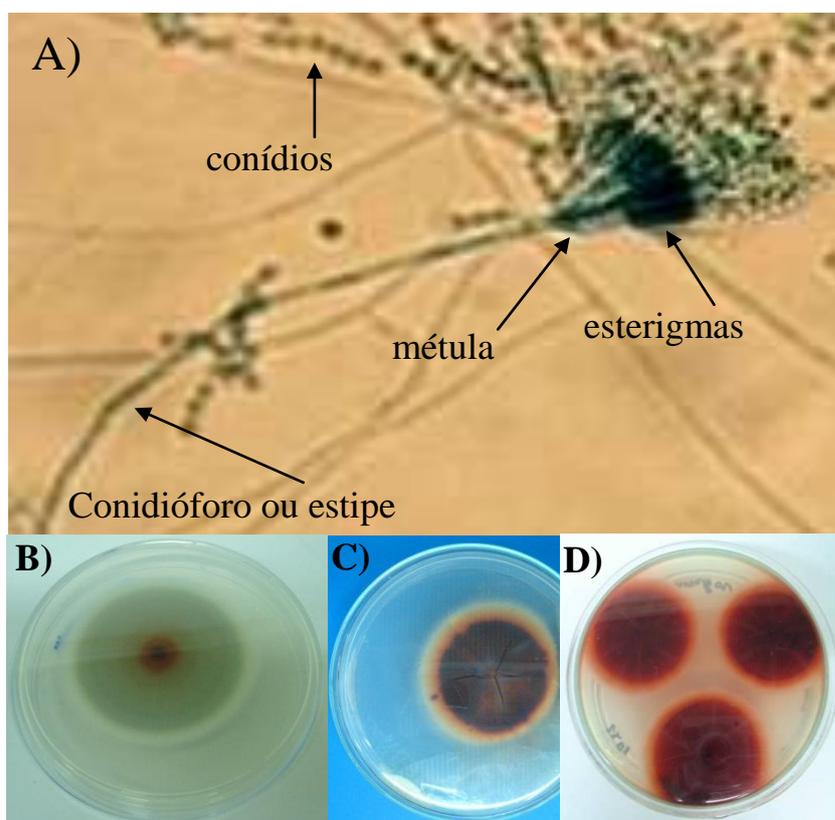


Figura 6. Aspecto morfológico de *P. purpurogenum* DPUA 1275: A) estruturas celulares observadas em microscópico óptico; aspecto macroscópico em meio Agar-água (B), CYA (C) e YES (D). Todos os crescimentos foram realizados durante 7 dias, a 25°C (autoria própria).

Ao término do cultivo em lâmina e da coloração das estruturas, foram observadas as seguintes estruturas: conidióforo ou estipe, métula, esterigmas dispostas na forma de pincel e conídios em cadeia. Com estes dados, foi feita a autenticação da linhagem de *P. purpurogenum*. Dessa forma, o cultivo monospórico proporcionou a obtenção de uma cultura pura, a qual pode sofrer menos mudanças morfológicas e fisiológicas quando comparada a uma cultura que já sofreu sucessivos repiques.

2.4.2 Influência do tempo de incubação, do tipo e do tamanho do inóculo na produção de colorantes

Na literatura, podem ser encontrados variados métodos de inoculação para fungos filamentosos; porém, os mais utilizados são a suspensão de esporos e os discos de micélio. Dessa maneira, ambos os métodos foram avaliados na produção de colorantes por *P. purpurogenum* DPUA 1275 em cultivo submerso a diferentes tempos de incubação (120, 216 e 288 horas) (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de colorantes naturais em diferentes métodos de inoculação (suspensão de esporos e discos de micélio) e tempo de incubação por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275. Os erros correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Método de Inoculação	Tempo (Horas)	Colorantes Amarelos (UA _{400nm})	Colorantes Laranjas (UA _{470nm})	Colorantes Vermelhos (UA _{490nm})	
Suspensão de esporos (esporos/mL)	10 ⁶	120	0,88 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,02 ± 0,01
		216	0,67 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,17 ± 0,01
		288	0,66 ± 0,07	0,22 ± 0,04	0,22 ± 0,03
	10 ⁷	120	0,90 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,01
		216	0,50 ± 0,01	0,21 ± 0,06	0,17 ± 0,03
		288	0,67 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,21 ± 0,01
	10 ⁸	120	1,15 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01
		216	0,71 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,22 ± 0,01
		288	0,70 ± 0,03	0,42 ± 0,08	0,34 ± 0,01
Discos de Micélio	5	120	0,79 ± 0,07	0,27 ± 0,07	0,17 ± 0,06
		216	1,79 ± 0,02	0,88 ± 0,07	1,13 ± 0,04
		288	1,38 ± 0,08	1,61 ± 0,02	0,99 ± 0,02
	10	120	0,55 ± 0,05	0,18 ± 0,02	0,65 ± 0,04
		216	1,55 ± 0,03	0,69 ± 0,04	0,50 ± 0,05
		288	1,48 ± 0,03	1,50 ± 0,04	0,86 ± 0,02
	15	120	0,89 ± 0,04	0,41 ± 0,02	0,75 ± 0,06
		216	0,91 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,94 ± 0,02
		288	1,42 ± 0,04	1,24 ± 0,07	0,78 ± 0,07

Enquanto que, para os colorantes amarelos, a máxima produção ocorreu após 120 horas de incubação, para os colorantes laranjas e vermelhos os melhores resultados foram obtidos no tempo de 288 horas de cultivo submerso. Em relação aos experimentos realizados com discos de micélio, a máxima produção dos colorantes amarelos ocorreu com 5 discos de micélio após 216 horas de incubação. Por outro lado, para 10 e 15 discos de micélio e após 216 horas, a produção dos colorantes amarelos diminuiu 3 e 20%, respectivamente, comparado a 5 discos de micélio. As mesmas condições obtidas para os colorantes amarelos promoveram a maior produção dos colorantes vermelhos. Todavia, os colorantes laranjas foram produzidos em maior quantidade, com o mesmo número de discos de micélio, mas após 288 horas de incubação.

Durante o período do cultivo submerso, muitos metabólitos são produzidos como resultado das vias metabólicas realizadas pelo micro-

organismo. Os resultados apresentados acima indicam que os colorantes amarelos são os primeiros metabólitos a serem produzidos durante cultivo submerso de *P. purpurogenum*. Assim, os colorantes laranjas e vermelhos podem ser produzidos em vias metabólicas mais complexas, que dependem de biocompostos sintetizados no início do metabolismo fúngico. Ademais, durante o processo metabólico, os colorantes amarelos podem ter sua estrutura química modificada, gerando os colorantes laranjas e vermelhos. A perda dos colorantes amarelos durante o processo pode ocorrer devido a sua degradação fotoquímica (PASTRANA *et al.*, 1995). A Figura 7 e a Figura 8 mostram o comportamento da biomassa e do pH para ambas as metodologias de inoculação.

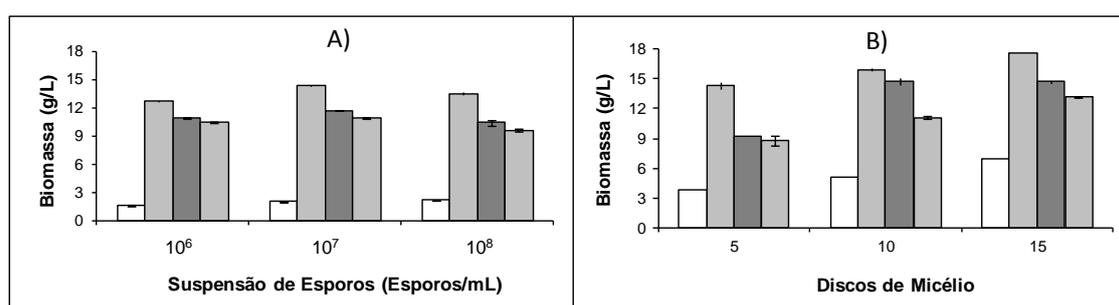


Figura 7. Concentração de biomassa a diferentes tempos de incubação [0 (barras brancas), 120 (barras cinza claras), 216 (barras cinza escuras) e 288 (barras mescladas) horas] durante cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 com discos de micélio (A) e suspensão de esporos (B) como método de inoculação. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A concentração de biomassa mudou no curso do estudo para ambas as metodologias. Em relação à suspensão de esporos (Figura 7B), a maior concentração de biomassa foi obtida depois de 120 horas de incubação, independentemente da concentração inicial de esporos. Para este tempo, a concentração de biomassa foi de 14,31 g/L para o estudo com 10⁷ esporos/mL, valor 7 vezes superior ao inicial (1,97 g/L).

Ao se utilizar discos de micélio (Figura 7A), o tempo de incubação de 120 horas gerou a maior concentração de biomassa. Todavia, neste caso, maior número de discos de micélio promoveu maior concentração de biomassa, que foi de 14,38, 15,92 e 17,54 g/L para 5, 10 e 15 discos de micélio, respectivamente. Desta maneira, para 216 e 288 horas de incubação,

a concentração de células foi menor do que a obtida depois de 120 horas em todas as condições avaliadas, como era esperado.

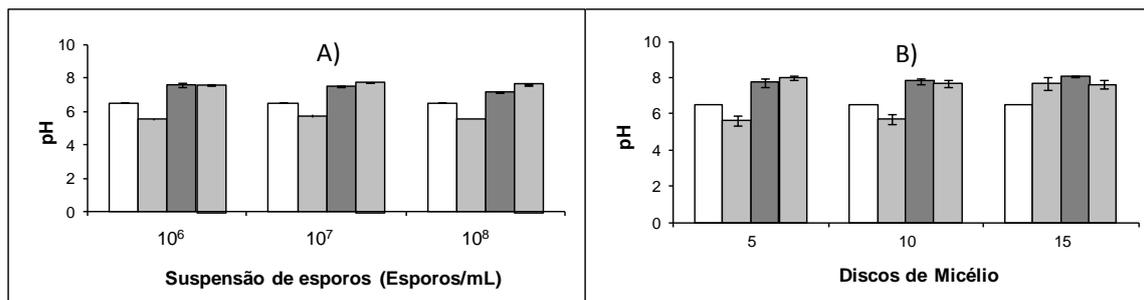


Figura 8. pH a diferentes tempos de incubação [0 (barras brancas), 120 (barras cinza claras), 216 (barras cinza escuras) e 288 (barras mescladas) horas] durante cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 com discos de micélio (A) e suspensão de esporos (B) como método de inoculação. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Para ambos os métodos de inoculação, o pH inicial do meio de cultivo foi de 6,50 e seu comportamento através do cultivo submerso em todas as condições avaliadas foi similar, exceto na condição em que 15 discos de micélio foram utilizados. Na última condição, o pH aumentou através do bioprocessamento e após 120 horas de cultivo seu valor foi de 7,70, o qual permaneceu constante nos outros tempos avaliados. O maior número de discos de micélio gerou a maior concentração de biomassa (17,54 g/L), o que pode ter promovido uma dificuldade para o micro-organismo se desenvolver metabolicamente da mesma maneira que nas outras condições avaliadas.

Para os experimentos com 120 horas de incubação, o valor do pH decaiu, variando de 5,51 a 5,75. Além disso, o pH aumentou para valores na faixa de $7,50 \leq \text{pH} \leq 8,00$, depois de 216 e 288 horas de bioprocessamento. As mudanças observadas para o pH a diferentes tempos de incubação estão relacionadas com substâncias produzidas durante o bioprocessamento, devido ao metabolismo do micro-organismo. No início, substâncias com características ácidas são produzidas e, após, são consumidas durante o metabolismo do micro-organismo, gerando, desta maneira, as biomoléculas alvo. Comportamento similar foi observado por Teng e Feldheim (2001) durante a produção de colorantes vermelhos por *Monascus purpureus*.

A partir dos resultados acima, a produção dos colorantes avaliados foi favorecida pelo uso de discos de micélio como método de inoculação. Este fato pode ser explicado pela condição fisiológica do micro-organismo em ambas as

condições. Para esclarecer esta hipótese, foi realizado um estudo da curva de crescimento do *P. purpurogenum* DPUA 1275, o qual está apresentado a seguir.

2.4.3 Curva de crescimento

A curva de crescimento de *P. purpurogenum* DPUA 1275 foi realizada com suspensão de esporos (10^8 esporos/mL) e discos de micélio (5) como método de inoculação. A Figura 9 mostra a curva de crescimento e o consumo de sacarose.

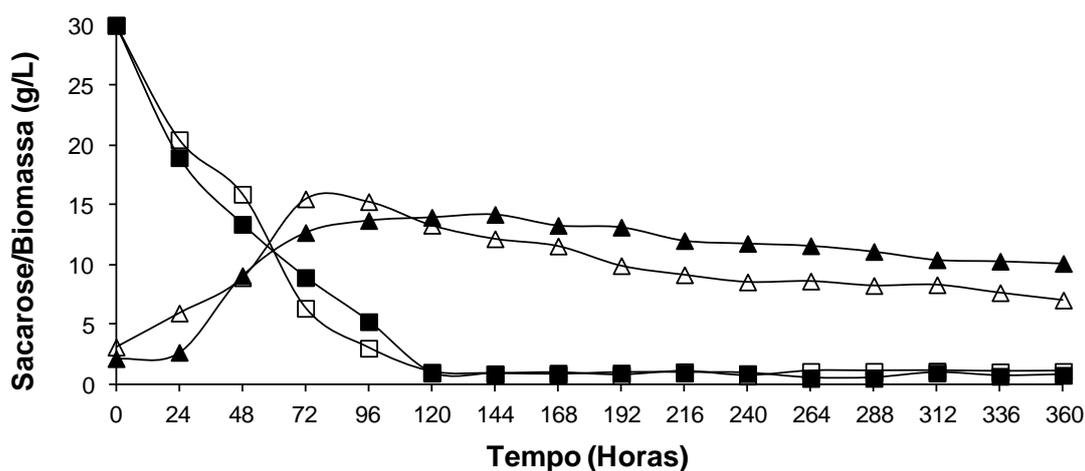


Figura 9. Consumo de sacarose (quadrado) e curva de crescimento de *P. purpurogenum* DPUA 1275 (triângulo) utilizando como método de inoculação suspensão de esporos (símbolo cheio) e discos de micélio (símbolo vazio) em função do tempo de cultivo submerso.

A partir da Figura 9, pode-se observar que a curva obtida com a suspensão de esporos (símbolos cheios), mostrou uma fase lag nas primeiras 24 horas de incubação, seguida de uma fase de crescimento celular, exponencial (fase na qual as células foram duplicadas), estacionária e de morte celular. Inicialmente, a concentração de biomassa foi de 2,41 g/L, depois, atingiu um pico de 14,17 g/L com 144 horas de incubação e, no final do estudo, a concentração final de células foi de 10,07 g/L.

Comportamento diferente ocorreu ao se inocular o micro-organismo com discos de micélio, já que pode ser observado o crescimento sem fase lag e que rapidamente se alcançou a fase exponencial. Esta situação ocorreu como resultado não somente da presença dos esporos, mas também das enzimas e

de outros metabólitos produzidos durante o tempo de inoculação em que o método de discos de micélio foi usado.

Como em uma suspensão de esporos, a solução foi preparada por raspagem, o micro-organismo pode ir para o meio de cultura em outro estado fisiológico, quando comparado ao inóculo com discos de micélio. Assim, o micro-organismo tem de se readaptar a este meio, justificando a fase lag observada na Figura 9 e que não está presente na curva de crescimento construída com os discos de micélio.

Além disso, a diferença observada entre os resultados obtidos com ambos os métodos de inoculação pode ser resultado da diminuição de 20% de biomassa em suspensão de esporos do que em discos de micélio. Desta maneira, a curva de crescimento com discos de micélio inicia-se com uma fase exponencial, seguida por uma fase estacionária e por uma fase de morte. Inicialmente, a concentração de biomassa foi de 3,07 g/L, então alcançou 15,48, depois de 72 horas. Após 360 horas, a biomassa caiu para 7,81 g/L.

A sacarose foi consumida com o mesmo comportamento em ambas as metodologias. Depois de 120 horas de cultivo submerso 97% da fonte de carbono havia sido consumida. A Figura 10 apresenta o comportamento do pH através das 360 horas do bioprocessamento.

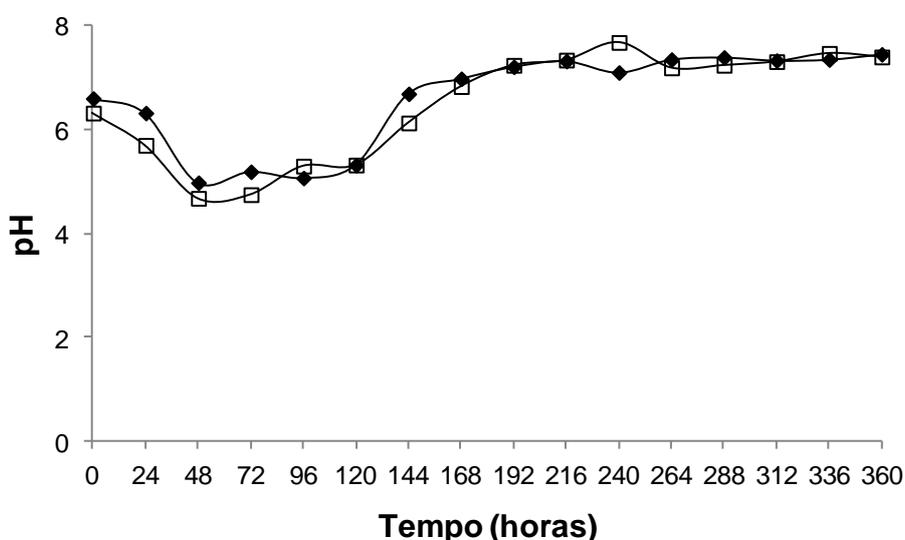


Figura 10. Comportamento do pH ao longo do crescimento do *P. purpurogenum* DP UA 1275 em função do meio de cultivo em meio CYA utilizando como método de inoculação suspensão de esporos (Δ) e discos de micélio (■).

O pH inicial foi de 6,5 em todas as condições e, como ocorreu anteriormente, o valor desta variável diminuiu no início do bioprocesso. O valor do pH se manteve ao redor de 4,5 no período de 48 a 120 horas de incubação para todas as condições estudadas. Depois deste tempo, o valor do pH aumentou, atingindo valores próximos a 7,50, o qual foi mantido até o fim do cultivo submerso. Como a produção dos colorantes laranjas e vermelhos ocorreu no fim do bioprocesso, estes metabólitos provavelmente foram formados e/ou excretados em condições mais alcalinas em ambas as condições de inoculação.

Saha *et al.* (2008) estudaram a produção de pigmentos fenazina por *Pseudomonas aeruginosa* e a máxima biomassa observada foi em 66 horas de incubação (60 g/L); com 72 horas, a biomassa entrou em decaimento, porém a produção de pigmento permaneceu em ascensão. Os resultados destes autores são similares aos apresentados neste trabalho, ou seja, o micro-organismo tem produção superior, à medida que o fungo entra na fase estacionária e de desaceleração do crescimento.

A Figura 11 apresenta o gráfico da produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, estimados em termos da absorbância destas biomoléculas, em função do tempo de cultivo com ambos os métodos de inoculação.

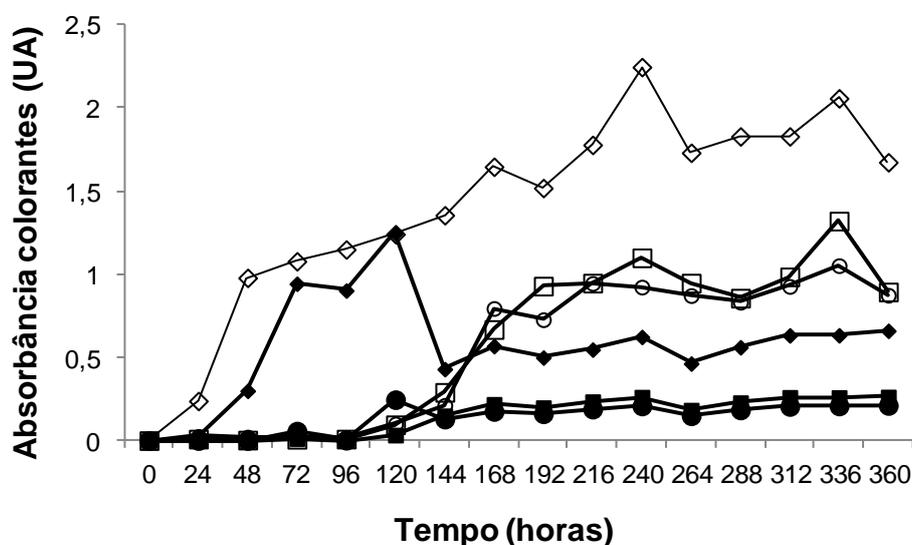


Figura 11. Produção de colorantes amarelos (◇), laranjas (□) e vermelhos (○) por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DP UA 1275 utilizando como método de inoculação suspensão de esporos (símbolos cheios) e discos de micélio (símbolos vazios).

A partir da Figura 11, pode-se observar que, de maneira geral, os discos de micélio proporcionaram produção superior de todos os colorantes analisados. Em ambos os métodos de inoculação, os colorantes amarelos foram produzidos antes dos demais e obteve-se máxima produção (2,246 UA_{400nm}) com discos de micélio após 240 horas de incubação. Em relação aos colorantes laranjas e vermelhos, a produção destes foi muito baixa ao se utilizar suspensão de esporos. Todavia, com a técnica de discos de micélio, suas produções iniciaram após 120 horas do cultivo submerso e tiveram ascensão a partir de 168 horas de incubação. A máxima absorvância para os colorantes laranjas e vermelhos foi 1,32 UA_{470nm} e 1,05 UA_{490nm}, respectivamente, depois de 336 horas e 5 discos de micélio. Estes resultados mostram que tanto os colorantes laranjas quanto os colorantes vermelhos são produzidos na fase de declínio e/ou de morte celular e estão de acordo com o encontrado na literatura, que diz que colorantes geralmente são metabólitos secundários de micro-organismos (PITT, 1985; PUTZKE; PUTZKE, 2002).

Na Tabela 3, apresentam-se os resultados de alguns parâmetros do cultivo para a seleção da metodologia de inoculação mais adequada visando a produção dos colorantes naturais.

Tabela 3. Resultados dos parâmetros de cultivo para a seleção da metodologia de inoculação.

	Y _{X/S} (g/g)	μ _{MÁX} (h ⁻¹)	Y _{P/S} (UA/g)			P _e (UA.L/g)		
			CA	CL	CV	CA	CL	CV
Suspensão de esporos	0,4120	0,0327	0,0425	0,0089	0,0084	0,0879	0,0303	0,0401
Discos de micélio	0,4283	0,0219	0,0775	0,0456	0,0363	0,1451	0,1135	0,1378

Y_{X/S}: fator de conversão de substrato (sacarose) a células.

μ_{MÁX}: velocidade máxima de crescimento.

Y_{P/S}: fator de conversão de substrato (sacarose) em produto.

P_e: produção específica obtida na máxima absorvância de cada colorante.

CA: colorantes amarelos; CL: colorantes laranjas; CV: colorantes vermelhos.

Através da Tabela 3, pode-se observar que o único parâmetro em que a técnica de suspensão de esporos promoveu resultados superiores a de discos de micélio foi na velocidade máxima de crescimento. A taxa de conversão de substrato em célula também gerou resultados muito próximos por ambas as técnicas. Porém, ao se analisar os parâmetros referentes à produção dos colorantes, a técnica por discos de micélio obteve resultados superiores. O

fator de conversão de células em produto, para os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, foi 1,8, 5,1 e 4,3 (respectivamente) vezes superior utilizando discos de micélio do que os valores obtidos com suspensão de esporos. Ao analisar a produtividade específica obtida na máxima absorvância, o método de discos de micélio proporcionou valores 1,7, 3,7 e 3,4 vezes superiores para os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, respectivamente. Desta maneira, o método de discos de micélio se mostrou mais adequado do que o de suspensão de esporos para a produção de colorantes naturais por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275.

2.4.4 Estudo de diferentes fontes de carbono e nitrogênio

A escolha dos nutrientes adequados à geração do produto de interesse está relacionada à atividade metabólica desenvolvida pelos micro-organismos. Neste ponto, destaca-se a importância das informações obtidas sobre as exigências nutricionais do organismo envolvido no processo. Assim, é preciso suplementar o meio de cultivo ou controlar os componentes que possam inibir o seu desenvolvimento, de modo a permitir a rápida e eficiente conversão da fonte de carbono em produto com rendimento desejável. Além disso, os organismos requerem nitrogênio para a síntese de compostos, como proteínas, compostos nitrogenados, vitaminas e ácido nucleico (DHAKE; PATIL, 2005).

Tabela 4 mostra as fontes de carbono avaliadas e os resultados de produção dos colorantes, de concentração de biomassa e de pH.

Tabela 4. Produção de colorantes naturais em diferentes métodos de inoculação (suspensão de esporos e discos de micélio) e tempo de incubação por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275. Os erros correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Fonte de carbono	Biomassa (g/L)	pH Final	Colorantes		
			Amarelos (UA _{400nm})	Laranjas (UA _{470nm})	Vermelhos (UA _{490nm})
Controle	2,29±0,26	7,57±0,06	0,69±0,24	0,16±0,03	0,02±0,00
Glicose	11,94±0,15	7,48±0,00	0,95±0,17	0,50±0,07	0,69±0,02
Frutose	11,98±0,09	7,59±0,08	0,97±0,08	0,28±0,06	0,50±0,01
Sacarose	9,70±0,08	7,41±0,09	1,65±0,06	0,83±0,05	0,93±0,05
Maltose	10,07±0,04	7,65±0,05	0,88±0,15	0,22±0,04	0,52±0,04
Amido	9,27±0,25	7,31±0,09	1,77±0,07	0,84±0,03	1,01±0,06

Os fungos são heterotróficos e requerem uma fonte exógena de carbono, sendo que algumas espécies utilizam compostos complexos que contêm carbono, porém outras são mais seletivas em seus requisitos (ESPOSITO, 2004). As fontes de carbono foram escolhidas conforme se encontrou na literatura a citação de bons resultados na produção de metabólitos secundários por fungos filamentosos (CHO *et al.*, 2002a; DHAKE; PATIL, 2005; GUNASEKARAN; POORNIAMMAL, 2008; LEE *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2009). Para tanto, monossacarídeos (glicose e frutose), dissacarídeos (sacarose e maltose) e amido foram analisados.

Dentre as fontes de carbono testadas, independentemente do colorante avaliado, os maiores resultados foram obtidos com a sacarose (1,65 UA_{400nm}, 0,83 UA_{470nm} e 0,93 UA_{490nm}) e o amido (1,77 UA_{400nm}, 0,84 UA_{470nm} e 1,01 UA_{490nm}). A sacarose é um dissacarídeo formado por glicose e frutose, enquanto que o amido é um polissacarídeo composto de dois polímeros (amilose e amilopectina), os quais são constituídos de unidades de glicose.

Era esperada que a adição de glicose e/ou de frutose no meio de cultivo promovesse maior produção de colorantes. Todavia, esse comportamento não foi observado. Uma possível repressão catabólica obtida com os monossacarídeos adicionados diretamente no meio pode ter sido responsável pelos resultados obtidos (DHAKE, 2005).

Resultado similar aos obtidos com os monossacarídeos ocorreu com a maltose, um dissacarídeo formado por dois resíduos de glicose. A diferença obtida entre a sacarose e a maltose pode ser resultado da maior facilidade de hidrólise da sacarose, que não possui átomos de carbono anomérico livre, levando à maior facilidade de metabolização deste carboidrato em relação à maltose (LEHNINGER, 1976).

Alguns trabalhos têm reportado que a adição de glicose no meio de cultivo afeta a síntese de enzimas. Este tipo de relação ocorre não somente em bactéria, mas também por fungos como *Aspergillus niger*, levando à interrupção na produção de poligalacturonase e pectina esterase (MALDONADO *et al.*, 1989); em *P. expansum*, ocorre redução na síntese de poligalacturonase (PICCOLI-VALLE *et al.*, 2003) e em *P. purpurogenum* com inibição da síntese de β -glicosidade (DHAKE; PATIL, 2005).

Neste estudo, nota-se que o fungo *P. purpurogenum* possui capacidade de adaptação e assimilação de diversas fontes de carbono, porém, não são

todos os substratos que favorecem a produção do metabólito desejável. As fontes que proporcionaram o maior crescimento micelial foram glicose e frutose e, em contrapartida, na condição controle (sem suplementação) a biomassa produzida foi, aproximadamente, 80% inferior em relação à obtida com a frutose. A preferência por frutose e glicose, compostos isômeros, sobre as demais fontes de carbono pode ser atribuída à facilidade destes açúcares em serem metabolizados durante a respiração celular (GRIFFIN, 1994). O pH final em todas as condições foi próximo a 7,0 (Tabela 4).

Cho *et al.* (2002b) estudaram a influência de 11 fontes de carbono na produção de pigmentos vermelhos por cultivo submerso de *Paecilomyces sinclairii*. Os resultados mostraram que glicose, frutose, manose, sacarose e maltose foram relativamente favoráveis ao crescimento micelial. A sacarose e o amido foram as fontes de carbono mais eficientes na produção de biomassa e dos colorantes vermelhos. Em trabalho posterior (CHO *et al.*, 2002a), os mesmos autores estudaram a influência destas fontes de carbono e a taxa de aeração por cultivo em batelada e verificaram que a sacarose foi relativamente favorável para o crescimento micelial, enquanto que maior produção de pigmento vermelhos foi obtida no meio com amido.

Gunasekaran e Poorniammal (2008) investigaram a otimização das condições de cultivo para produção de pigmentos vermelhos em cultivo submerso. Os autores investigaram a influência de 11 fontes de carbono na produção de pigmentos vermelhos e do crescimento micelial de *Penicillium* sp. por 5 dias a 30°C. O amido proporcionou a maior produção de pigmentos, seguido pela maltose e pela glicose. Em relação ao crescimento micelial, a frutose, a xilose e a dextrose foram as melhores fontes de carbono.

A partir dos resultados obtidos – e os aliando com os encontrados na literatura –, o consumo de fonte de carbono pareceu ser linhagem-dependente, uma vez que, em alguns relatos bibliográficos, foram observados crescimento e produção de colorantes no meio contendo sacarose como fonte de carbono; já, para outros micro-organismos, a produção de colorantes é favorecida por uma fonte de carbono diferente. Além disso, se uma mesma espécie de fungo precisa de uma diferente fonte de carbono para a produção de um metabólito específico, é possível que diferentes fontes de carbono possam ter diferentes efeitos na repressão catabólica no metabolismo secundário celular.

Como os melhores resultados foram obtidos com sacarose e amido solúvel, e levando em consideração que a sacarose é mais favorável do que o amido em termos de custo, essa fonte de carbono foi escolhida para os estudos posteriores. A Tabela 5 mostra os resultados de produção de colorantes naturais, biomassa e pH final variando-se a fonte de nitrogênio.

Tabela 5. Produção de colorantes naturais em diferentes métodos de inoculação (suspensão de esporos e discos de micélio) e tempo de incubação por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275. Os erros correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Fontes de Nitrogênio	Biomassa (g/L)	pH Final	Colorantes		
			Amarelos (UA _{400nm})	Laranjas (UA _{470nm})	Vermelhos (UA _{490nm})
Controle	8,02±0,60	4,15±0,12	0,36±0,07	0,14±0,05	0,15±0,05
Extrato de Malte	14,61±0,36	6,70±0,04	1,02±0,23	0,53±0,08	0,48±0,06
Sulfato de amônio	11,51±0,86	3,10±0,06	0,13±0,09	0,04±0,00	0,07±0,01
Peptona	9,03±0,42	7,48±0,09	1,13±0,09	0,54±0,04	0,44±0,03
Extrato de levedura	12,12±0,26	7,64±0,15	2,01±0,10	0,94±0,14	0,71±0,09
Triptona	13,71±0,47	7,62±0,03	0,46±0,16	0,19±0,01	0,18±0,09

As fontes de nitrogênio avaliadas, em relação à produção de colorantes que apresentaram os melhores resultados, foram extrato de levedura e extrato de malte. O extrato de levedura pode ter promovido os melhores resultados, por ser uma excelente fonte de aminoácidos e vitaminas (ANTUNES, 1997), que estão disponíveis de maneira que o micro-organismo pode metabolizar de modo mais eficiente, se comparada com outras fontes avaliadas.

Apesar do sulfato de amônio ter promovido bom crescimento celular (11,51 g/L), esta fonte de nitrogênio inibiu fortemente a produção de colorantes, isto é, a presença deste substrato no meio de cultivo pode ter induzido a produção de substâncias tóxicas à célula e acentuado a produção de compostos ácidos, inibindo a produção de colorantes e acarretando em pH muito ácido (3,10). De acordo com a literatura, os micro-organismos, de maneira geral, conseguem assimilar mais facilmente a amônia do que outras fontes de nitrogênio encontradas na natureza (PUTZKE; PUTZKE, 2002). Porém, a produção de metabólitos não segue o mesmo princípio, já que sua síntese depende da assimilação da fonte e de sua metabolização pela rota metabólica mais favorável.

O extrato de malte promoveu a maior produção de biomassa (14,61 g/L), porém, a produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos foi 97, 77 e

47%, respectivamente, superior ao se utilizar o extrato de levedura quando comparado ao extrato de malte. Este resultado pode estar correlacionado com o pH do meio após o cultivo submerso, que foi de 6,70 enquanto que com o extrato de levedura o pH final aferido foi de 7,64.

O pH inicial de todos os meios foi 6,5 e este variou ao longo do cultivo conforme a fonte de nitrogênio utilizada. Como dito anteriormente, o sulfato de amônio proporcionou o valor mais baixo desta variável (3,10). A falta de nitrogênio no meio (controle) acarretou em pH de 4,15, indicando que o micro-organismo não desenvolveu a mesma rota metabólica, sintetizando metabólitos diferentes dos produzidos nas condições com diferentes fontes de nitrogênio – sem se levar em consideração o experimento realizado com sulfato de amônio. Para as demais fontes de nitrogênio, o pH variou entre 6,0 e 7,0, porque estes meios proporcionaram desenvolvimento similar no interior da célula, porém a produção de colorantes e crescimento celular foi inferior ao meio com extrato de levedura.

É interessante notar ainda que, na condição controle (sem suplementação de uma fonte de nitrogênio principal), o crescimento celular foi similar ao do meio com extrato de levedura, porém com produção de colorantes inferior. Assim, o micro-organismo cresceu em um meio de cultivo somente com carbono, mas a produção de metabólitos foi prejudicada, uma vez que, devido à falta de nutrientes essenciais, não ocorreram algumas vias metabólicas indispensáveis para a produção dos colorantes. Como mencionado por Babitha *et al.* (2007), a fonte de nitrogênio é um importante fator para o crescimento e a produção de colorantes por micro-organismos.

Cho *et al.* (2002a) estudaram a influência de fontes orgânicas e inorgânicas no crescimento micelial e na produção de pigmentos vermelhos em cultivo submerso de *Paecilomyces sinclairii*. Dentre as fontes testadas, peptona de soja e extrato de malte inibiram fortemente a síntese do pigmento, assim como as fontes inorgânicas. O extrato de levedura proporcionou valores intermediários, enquanto maior rendimento em termos de produção de pigmentos (428 mg/L) ocorreu com peptona de carne.

Gunasekaran e Poorniammal (2008) investigaram, além da melhor fonte de carbono para a produção de pigmentos por cultivo submerso de *Penicillium* sp., a melhor fonte de nitrogênio. As fontes de nitrogênio testadas foram: peptona, extrato de carne, extrato de levedura, extrato de levedura+peptona,

glutamato monossódico, peptona de soja, nitrato de amônia, triptona, nitrato de sódio e nitrato de potássio. Os autores verificaram que peptona, a mistura peptona+extrato de levedura, triptona e glutamato monossódico tiveram efeito positivo na produção de pigmento, enquanto peptona de soja, extrato de carne e nitrato de potássio inibiram fortemente a síntese de pigmentos. Os resultados destes autores corroboram com os obtidos neste trabalho, os quais indicam que boa produção de colorantes ocorreu com extrato de levedura, peptona e triptona.

Apesar de diversos autores reportarem que vários tipos de peptona favorecem maiores produções de pigmento em muitas espécies fúngicas (CHEN; JOHNS, 1993; CHO *et al.*, 2002b; FANG; CHENG, 1993; KANG *et al.*, 1996), neste trabalho a fonte de nitrogênio que favoreceu a produção de colorantes foi o extrato de levedura.

2.5 Conclusão

O presente trabalho descreve condições para a produção de colorantes naturais por *P. purpurogenum* DPUA 1275, um novo produtor de colorantes naturais que podem representar uma alternativa segura para substituir os colorantes sintéticos para aplicação industrial. As condições estabelecidas pelo micro-organismo para a produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos foram: 5 discos de micélio, 336 horas de cultivo submerso e sacarose e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Desta maneira, nossos resultados indicam um meio economicamente vantajoso de produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos para indústrias farmacêutica e alimentícia - depois de consideráveis estudos toxicológicos.

3. CAPÍTULO III

Improvement of submerged culture conditions to produce colorants by *Penicillium purpurogenum*

Valéria Carvalho Santos-Ebinuma, Inês Conceição Roberto, Maria Francisca
Simas Teixeira, Adalberto Pessoa Jr.

Este artigo foi submetido no periódico *Brazilian Journal of Microbiology*, com fator de impacto igual a 0,896. Submissão em 6-Novembro-2012.

Seleção das condições de cultivo submerso visando à produção de colorantes por *Penicillium purpurogenum*

3.1 Resumo

Questões de segurança relacionadas ao emprego de colorantes sintéticos em diferentes segmentos industriais têm elevado o interesse na produção de colorantes por fontes naturais, como os micro-organismos. A otimização da tecnologia de cultivo tem permitido o uso de micro-organismo como fonte alternativa de colorantes naturais. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de alguns fatores na produção de colorantes naturais por micro-organismo recentemente isolado da floresta amazônica, *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275, empregando ferramenta estatística. Para tanto, dois planejamentos fracionários, um planejamento fatorial completo e um planejamento central composto foram realizados. A análise de regressão apontou que as concentrações de sacarose e de extrato de levedura foram as variáveis que exerceram maior influência sobre a produção dos colorantes. Sob as melhores condições (10 g/L de extrato de levedura e 50 g/L de sacarose) foi obtido o aumento de 10, 33 e 23 % para os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, respectivamente. Estes resultados mostram que *Penicillium purpurogenum* é um produtor de colorantes e que a produção destes metabólitos pode ser incrementada através de ferramenta estatística. Em adição, os colorantes naturais produzidos podem ser usados como alternativa a outros disponíveis no mercado, depois de consideráveis estudos toxicológicos.

Palavras-chave: colorantes naturais; fungos filamentosos, otimização, cultivo submerso.

3.2 Introdução

Colorantes sintéticos e naturais têm sido usados extensivamente nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (HAILEI et al., 2011; MAPARI et al., 2005). Todavia, como colorantes sintéticos têm apresentado características tóxicas indesejáveis, como carcinogenicidade, recentemente os colorantes naturais têm ganhado popularidade em relação aos agentes colorantes sintéticos (KONGRUANG, 2011). Colorantes naturais podem ser extraídos de fontes naturais, como plantas, insetos (BOO et al., 2012; DEVEOGLU et al., 2012) e micro-organismos (CHO et al., 2002; JIANG et al., 2011; MÉNDEZ et al., 2011). A produção por este último é muito interessante do ponto de vista industrial, porque micro-organismos podem crescer rapidamente com alta produtividade e sem problemas de sazonalidade (JIANG et al., 2005; MÉNDEZ et al., 2011), além do que, os colorantes microbianos são frequentemente mais estáveis e solúveis do que os produzidos por plantas e animais (GUNASEKARAN; POORNIAMMAL, 2008).

Muitos fungos ascomicetos sintetizam e secretam naturalmente colorantes e podem ser considerados uma fonte confiável de colorantes orgânicos naturais com funcionalidade aprimorada (DURAN et al., 2002; MAPARI et al., 2009). A diversidade de colorantes fúngicos não é somente encontrada em relação à estrutura química, mas também na faixa de cores geradas (MAPARI et al., 2009). Como a maior parte dos estudos encontrados na literatura a respeito de colorantes fúngicos é com espécie de *Monascus* e existe grande número de outros fungos a serem explorados, há interesse na pesquisa por organismos alternativos capazes de produzir colorantes (HAILEI et al., 2011).

Recentemente, tem sido reportado na literatura (HAILEI et al., 2011; MAPARI et al., 2008; MÉNDEZ et al., 2011) que cepas de *Penicillium* são potenciais produtores de colorantes naturais com cromóforos similares aos dos colorantes de *Monascus* (MAPARI et al., 2008). Dentre as espécies de *Penicillium*, *P. purpurogenum* pode produzir colorantes não somente em meio sólido, mas também em meio líquido (MÉNDEZ et al., 2011). Em estudos conduzidos por nosso grupo de pesquisa (TEIXEIRA et al., 2012), *P. purpurogenum* DPUA 1275 mostrou potencial de produzir colorantes naturais

com significativa atividade antimicrobiana e ausência de toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina*.

Como citado por Meinicke *et al.* (2012), muitos fatores, como pH inicial, temperatura e substrato, podem influenciar significativamente a produção de metabólitos secundários. Desta maneira, antes do isolamento dos colorantes, otimizar as condições de operação, como pH, temperatura, velocidade de agitação e fatores nutricionais para maximizar a produção de colorantes, é necessário (MUKHERJEE; SINGH, 2011).

Comparando métodos estatísticos e clássicos para otimização de processos, o primeiro representa uma alternativa segura e confiável, desde que métodos clássicos sejam baseados somente no estudo de uma variável independente por vez, enquanto que os outros fatores são mantidos fixos em um nível (GONÇALVES *et al.*, 2012). Além disso, aproximações clássicas são intrinsicamente incapazes de identificar interações entre os parâmetros de processo (QUEIROGA *et al.*, 2012).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é frequentemente usada para otimizar um processo usando ferramenta estatística. Este modelo é usualmente construído para os fatores definidos de um meio por equação polinomial quadrática para descrever os efeitos de interação entre as variáveis (ZAFAR *et al.*, 2012). O objetivo deste conjunto de técnicas estatísticas é executar o plano experimental pela construção de modelos empíricos e avaliar o efeito independente das variáveis na desejável variável resposta (BOX; WILSON, 1951; GONÇALVES *et al.*, 2012). Esta metodologia reduz o número de experimentos e fornece informação suficiente para um resultado aceitável estatisticamente (GUO, J. *et al.*, 2012). Desta maneira, análise da superfície de resposta e experimentos ortogonais são aproximações comumente usadas e úteis na otimização de bioprocessos (GÖSUNGUR *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2012).

No presente estudo, a influência de seis variáveis independentes (concentração de sacarose e de extrato de levedura, pH, temperatura, velocidade de agitação e tempo de incubação) na produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 foi avaliada empregando ferramenta estatística.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Reagentes

Sacarose e extrato de levedura foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brazil) e Acumedia (Lansing, Michigan, USA), respectivamente. Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

3.3.2 Micro-organismo

A cepa de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 foi cedida pela Coleção de Culturas DPUA, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, AM, Brasil. A cultura estoque foi mantida em tubos inclinados contendo meio de cultura Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA). Para a manutenção das culturas de *P. purpurogenum*, estas foram mantidas em tubos inclinados contendo meio CYA, incubados a 25°C, por sete dias, e conservados em geladeira a 4°C, sendo repicados a cada 30 dias.

3.3.3 Meio de cultura e preparo do inóculo

O meio CYA foi usado como o meio de crescimento. Este meio tem a seguinte composição (g/L água deionizada): K_2HPO_4 (1,0), extrato de levedura (5,0), sacarose (30,0), Ágar (15,0) e 10 ml/L de Czapeck concentrado [$NaNO_3$ (30,0 g), KCl (5,0 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5,0 g), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g), água deionizada q.s.p. 100 mL] (PITT, 1985). A composição do meio de produção foi similar à utilizada no inóculo, exceto pela concentração de sacarose e de extrato de levedura, que variou conforme o planejamento experimental selecionado.

Para os experimentos de produção, frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL do requerido meio foram inoculados com 5 discos de micélio (8 mm de diâmetro) retirados da margem de colônia crescida em Placa de Petri contendo CYA, a 30 °C/7 dias. Os valores do pH e as demais condições experimentais variaram de acordo com o planejamento fatorial. Ao fim do cultivo submerso, amostras foram coletadas e usadas para determinação do pH, concentração de sacarose e produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos.

3.3.4 Métodos analíticos

O meio fermentado foi filtrado em papel de filtro Whatman n°1 (Whatman, England) e em membrana Millipore 0,45 µm. A concentração de biomassa fúngica foi determinada por peso seco. A partir do filtrado, determinou-se a produção de colorantes, pH e consumo de sacarose. A concentração de sacarose foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Dubois *et al.* (1956) e o pH foi medido em pHmetro.

A produção de colorantes extracelulares foi estimada através da medida da absorbância dos filtrados. O comprimento de onda de cada colorante foi varrido na faixa de 350 a 600 nm. A leitura do sobrenadante ocorreu a 400, 470 e 490 nm, que correspondem à máxima absorbância para os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, respectivamente, usando aparelho espectrofotômetro e considerando o fator de diluição de cada amostra. Os resultados foram expressos em termos de Unidades de Absorbância (UA). A máxima absorção obtida para cada colorante está de acordo com os resultados reportados por Johns e Stuart (1991).

3.3.5 Planejamento fatorial

Inicialmente, a seleção das variáveis que influenciam a produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos por *Penicillium purpurogenum* foi realizada usando três diferentes planejamentos fatoriais, como segue: planejamento estatístico fracionário do tipo 2^{6-2} (20 experimentos), planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{4-1} (12 experimentos) e planejamento completo do tipo 2^3 (12 experimentos). Depois de cada série de experimentos, uma variável foi mantida constante. Desta maneira, depois do primeiro planejamento fatorial, a temperatura e o tempo de cultivo submerso foram mantidos a 30 °C e 336 horas, respectivamente. No segundo e no terceiro planejamentos fatoriais, o pH 4,5 foi selecionado e a velocidade de agitação foi mantida em 150 rpm. A Tabela 6 apresenta os fatores e os níveis utilizados em cada um dos planejamentos citados acima.

Tabela 6. Variáveis e níveis dos fatores usados nos planejamentos fatoriais 2^{6-2} , 2^{4-1} e 2^3 para estudar a produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos em cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275.

Fatores	Níveis		
	Superior (+1)	Central (0)	Inferior (-1)
Planejamento 2^{6-2}			
Velocidade de agitação (rpm)	120	150	180
pH	4,5	6,0	7,5
Temperatura (°C)	25	30	35
Sacarose (g/L)	10	30	50
Extrato de levedura (g/L)	3	5	7
Tempo de cultivo (horas)	144	240	336
Planejamento 2^{4-1}			
pH	4	4,5	5
Velocidade de agitação (rpm)	120	150	180
Extrato de levedura (g/L)	6	7	8
Sacarose (g/L)	50	60	70
Planejamento 2^3			
Velocidade de agitação (rpm)	150	180	250
Sacarose (g/L)	45	50	55
Extrato de levedura (g/L)	7	8	9

Na segunda parte do trabalho, a influência das variáveis independentes, especificamente, concentração de sacarose e extrato de levedura, sobre as respostas colorantes amarelos, laranjas e vermelhos foi avaliada usando planejamento central composto do tipo 2^2 com três níveis codificados com 12 ensaios, que continha uma matriz fatorial com pontos centrais e pontos de estrela para permitir a estimativa da curvatura (CHEN *et al.*, 2002). Uma unidade foi designada como a distância do centro do espaço do planejamento estatístico para pontos equidistantes, enquanto a unidade de α foi designada como a distância do centro do espaço a um ponto de estrela. Os pontos de estrela representam novos valores extremos (mais alto e mais baixo) para cada variável do planejamento, então $\alpha = [2k]^{1/4}$ e, neste estudo, $k = 2$ variáveis (concentração de extrato de levedura e sacarose). Os níveis estudados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Níveis dos fatores utilizados no primeiro e no segundo planejamentos centrais compostos do tipo 2^2 no estudo das melhores condições de cultivo para a produção de colorantes naturais por *P. purpurogenum* DPUA 1275.

Fatores	Níveis				
	Axial (- 1,41)	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+ 1)	Axial (+1,41)
Planejamento 2^2					
Sacarose (g/L)	48	50	55	60	62
Extrato de levedura (g/L)	7,6	8	9	10	10,4

Para elaboração estatística, os valores reais de cada variável independente (X_i) foram codificados de acordo com a equação:

$$x_i = \frac{X_i - X_o}{\Delta X_i} \quad \text{equação 5}$$

em que x_i representa o valor codificado correspondente, X_o , o valor real do ponto central e ΔX_i , o valor de cada passo.

Para identificar as melhores condições para a produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, um modelo quadrático expresso pela equação 6 foi usado:

$$\hat{y}_i = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_i x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad \text{equação 6}$$

em que \hat{y}_i são os valores previstos para cada resposta, b_0 e b_i a interceptão e os coeficientes lineares e quadráticos, respectivamente, e b_{ij} suas interações.

A versão estatística 7,0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) foi usada para regressão e análise gráfica dos dados. A significância estatística dos coeficientes de regressão foi determinada pelo teste de Fischer para análise da variância (ANOVA) ao nível de significância (p) $\leq 0,05$. A extensão da variância explicada pelo modelo foi dada pela determinação do coeficiente de determinação R^2 . Para minimizar o erro de ANOVA, os correspondentes testes foram realizados em quadruplicata no ponto central. Os experimentos e os valores previstos foram comparados em ordem de determinar a validade dos modelos. Os resultados de pH, biomassa, consumo de sacarose e produção de colorantes para cada ensaio a cada 48 horas estão apresentados no Apêndice C.

3.4 Resultados e discussão

É bem conhecido que a produção de metabólitos por micro-organismos pode ser influenciada pelos componentes do meio, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, fatores físico-químicos como pH, temperatura, tamanho do inóculo, velocidade de agitação e tempo de incubação (CELIK; CALIK, 2004; LIMA *et al.*, 2009; OH *et al.*, 2000). Dessa maneira, para estudar a influência das variáveis velocidade de agitação, pH, temperatura, tempo e concentração de sacarose e extrato de levedura sobre a produção de colorantes naturais por *P. purpurogenum* DPUA 1275, utilizou-se a ferramenta estatística para selecionar as variáveis mais importantes ao processo. A metodologia de planejamento experimental é muito importante, porque permite reduzir o número de experimentos e identificar as variáveis independentes – e suas interações – com significância estatística (SANTOS *et al.*, 2011).

3.4.1 Primeiro planejamento fatorial para a produção dos colorantes

Inicialmente, utilizou-se um planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} , que é uma resolução de *screening* IV. Esta análise é muito interessante para investigação inicial, desde que este planejamento diminua o número de experimentos quando comparado a um planejamento fatorial completo, com seis variáveis. Este tipo de planejamento não é completamente saturado, não misturando efeitos principais com 1ª ordem, o que garante a confiança nos cálculos dos efeitos das variáveis nas respostas analisadas, sem perda na qualidade estatística das informações. Esta estratégia é bem adequada para um *screening* inicial, uma vez que é capaz de avaliar os efeitos principais e, a partir de cada, decidir a estratégia para o planejamento seguinte e obter uma condição otimizada (RODRIGUEZ; IEMMA, 2005). Além disso, pode-se assumir que as interações de terceira ordem são menos importantes do que as de primeira, e, por fim, que a primeira aproximação pode ser negligenciada (CAVALCANTI *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2009). Desta maneira, as interações de terceira ordem no presente trabalho não foram consideradas. Os principais resultados da produção dos colorantes naturais pelo cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275, de acordo com o planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} , estão listados na Tabela 8.

Tabela 8. Combinação dos níveis das seis variáveis independentes (velocidade de agitação, pH, temperatura, sacarose, extrato de levedura e tempo de cultivo) usadas no planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} e suas respectivas respostas (colorantes amarelos, laranjas e vermelhos).

Ensaio	Velocidade de Agitação (rpm)	pH	Temp. (°C)	Sacarose (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	Tempo de Cultivo (horas)	Colorantes Amarelos (UA _{400nm})	Colorantes Laranjas (UA _{470nm})	Colorantes Vermelhos (UA _{490nm})
1	120	4,5	25	10	3	144	0,110	0,016	0,018
2	180	4,5	25	10	7	144	0,604	0,244	0,155
3	120	7,5	25	10	7	336	0,747	0,301	0,192
4	180	7,5	25	10	3	336	0,589	0,228	0,143
5	120	4,5	37	10	7	336	2,605	1,732	0,996
6	180	4,5	37	10	3	336	0,853	0,448	0,336
7	120	7,5	37	10	3	144	0,663	0,277	0,218
8	180	7,5	37	10	7	144	0,719	0,383	0,275
9	120	4,5	25	50	3	336	2,616	1,875	1,173
10	180	4,5	25	50	7	336	2,803	1,327	1,660
11	120	7,5	25	50	7	144	0,708	0,037	0,022
12	180	7,5	25	50	3	144	0,296	0,101	0,074
13	120	4,5	37	50	7	144	0,910	0,291	0,183
14	180	4,5	37	50	3	144	0,368	0,136	0,085
15	120	7,5	37	50	3	336	1,453	0,402	0,249
16	180	7,5	37	50	7	336	2,242	1,068	0,983
17 (C)	150	6,0	30	30	5	240	1,246	0,656	0,447
18 (C)	150	6,0	30	30	5	240	1,123	0,775	0,561
19 (C)	150	6,0	30	30	5	240	1,240	0,796	0,576
20 (C)	150	6,0	30	30	5	240	1,106	0,673	0,591

A partir da Tabela 8, pode-se observar que, dentre os 20 ensaios realizados, a produção de colorantes amarelos variou entre 0,110 e 2,803 UA_{400nm}, a de colorantes laranjas entre 0,016 e 1,875 UA_{470nm} e a de colorantes vermelhos entre 0,018 e 1,660 UA_{490nm}. No entanto, os melhores resultados foram encontrados no ensaio 10, para os colorantes amarelos e vermelhos, e no ensaio 9, para os colorantes laranjas. Estes ensaios têm, em comum, quatro fatores entre os seis analisados: pH (4,5), temperatura (25°C), concentração de sacarose (50 g/L) e tempo de cultivo (336 horas).

Os gráficos de Pareto para todas as respostas estão apresentados na Figura 12. O gráfico de Pareto representa os efeitos estimados das variáveis (efeito principal ou de primeira ordem) e das interações entre as variáveis (efeito de segunda ordem) sobre a variável resposta em ordem de magnitude. O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significantes, ou seja, as barras que se estendem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significantes com nível de confiança de 95% (ZEA *et al.*, 2004).

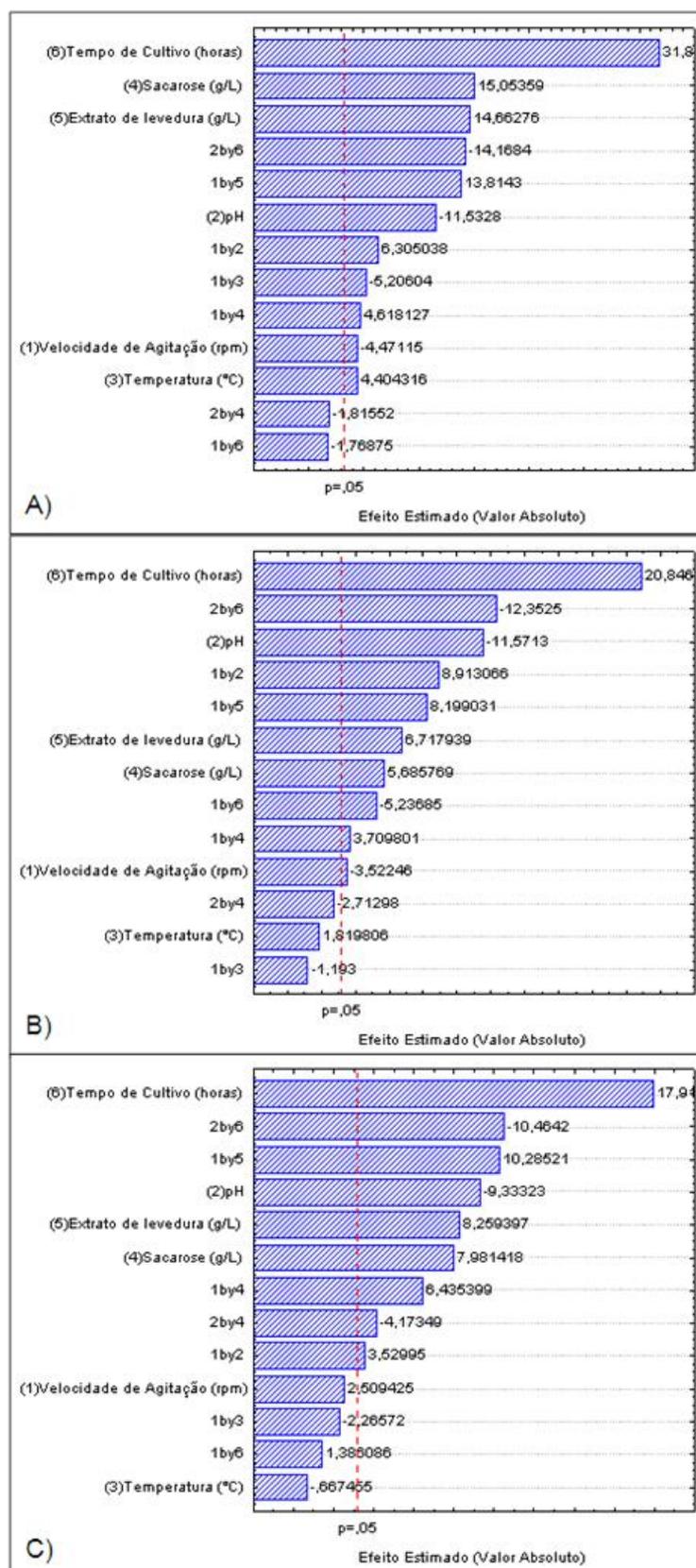


Figura 12. Gráfico de Pareto dos efeitos principais velocidade de agitação (1), pH (2), temperatura (3), concentração de sacarose (4) e extrato de levedura (5) e tempo de incubação (6) sobre as variáveis respostas: produção dos colorantes amarelos (A), laranjas (B) e vermelhos (C), tendo como variável-resposta a produção do colorantes vermelhos.

Pode-se observar, a partir da Figura 12, que todas as variáveis principais foram significativas para a resposta produção dos colorantes amarelos. Todavia, para os colorantes laranjas (Figura 12B), a temperatura não mostrou efeito significativo e, para os colorantes vermelhos (Figura 12C), tanto a temperatura quanto a velocidade de agitação não apresentaram efeito significativo.

Desta maneira, as principais variáveis independentes que mostraram efeito significativo para todas as variáveis respostas foram tempo de incubação, pH, concentração de extrato de levedura e sacarose. O tempo de incubação foi uma variável principal que apresentou efeito significativo, o que significa que o aumento deste parâmetro pode melhorar os resultados. Como é bem conhecido que colorantes naturais são, geralmente, metabólitos secundários e uma modificação da concentração dos componentes nutricionais no meio de cultura pode promover alterações, não somente no crescimento do micro-organismo, mas também em seu metabolismo, diferentes tempos de incubação foram estudados. Porém, verificou-se que o maior tempo de incubação gerava os melhores resultados. Desta maneira, esta variável não foi concluída no planejamento fatorial seguinte e o tempo de incubação foi mantido no nível superior utilizado no planejamento (336 horas).

Para a variável principal pH, as análises indicaram o nível inferior como o que proporcionaria os melhores resultados para a produção de colorantes. Por outro lado, as variáveis concentração de sacarose e extrato de levedura mostraram efeito positivo, de modo que maiores concentrações de ambas as fontes nutricionais acarretariam em produção superior. A partir da literatura, é sabido que, uma vez que as necessidades nutricionais são fornecidas, muitos fungos crescem em valores de pH que variam de 4,0 a 7,0 (3).

A velocidade de agitação (1) mostrou efeito significativo ao interagir com pH (1*5), sacarose (1*2) e extrato de levedura (1*4). A interação entre pH e tempo de incubação (2*6) também mostrou efeito significativo sobre todas as variáveis respostas. A interação 1 foi significativa no nível superior (+). Como variável independente, a concentração de extrato de levedura foi significativa no nível superior. Então, para manter as interações com esta fonte de nitrogênio no nível superior, a velocidade de agitação foi mantida no mesmo nível. Para a interação 1*4, o mesmo argumento utilizado para a interação 1*5 pode ser aplicado e o nível da velocidade de agitação tem de ser o nível

superior. Para a interação 1*2, o planejamento fatorial mostrou que trabalhar com as interações no nível superior é mais favorável. Como para a variável pH, o planejamento fatorial mostrou que trabalhar no nível inferior gerou o melhor resultado. Assim, a velocidade de agitação tem de ser usada no nível superior.

Como a temperatura apresentou efeito significativo somente para os colorantes amarelos, no planejamento fatorial seguinte esta variável foi mantida a 30°C, que corresponde ao ponto central usado neste planejamento fatorial. É conhecido que muitos fungos requerem longos períodos para gerar produtos em cultivo submerso, sendo expostos ao risco de contaminação. Assim, esta temperatura é considerada favorável para manter as propriedades fisiológicas do micro-organismo (GUNASEKARAN; POORNIAMMAL, 2008).

Até mesmo a velocidade de agitação como variável principal não teve efeito significativo para todas as respostas; já sua interação com algumas das variáveis independentes foi significativa. Este fato está provavelmente relacionado com a homogeneização dos nutrientes no meio de cultura e no comportamento do micro-organismo. Como o micro-organismo usado neste trabalho é um fungo filamentoso, ele pode crescer na forma de *pellets*, aumentando a viscosidade do meio e promovendo problemas na transferência de massa, o que resulta em menor produtividade. De acordo com a literatura, para cada cultura, as condições ótimas da intensidade de agitação parcialmente dependerão da resistência da hifa em relação à força mecânica e a seu estado fisiológico (PAPAGIANNI, 2004). Então, encontrar as melhores condições de velocidade de agitação é essencial para melhorar a produção, assim, esta variável foi incluída no planejamento fatorial seguinte no mesmo nível estudado previamente.

Na Figura 13, estão apresentados os resultados referentes à biomassa, ao consumo de sacarose e ao pH de cada um dos ensaios realizados no planejamento fatorial fracionário 2⁶⁻².

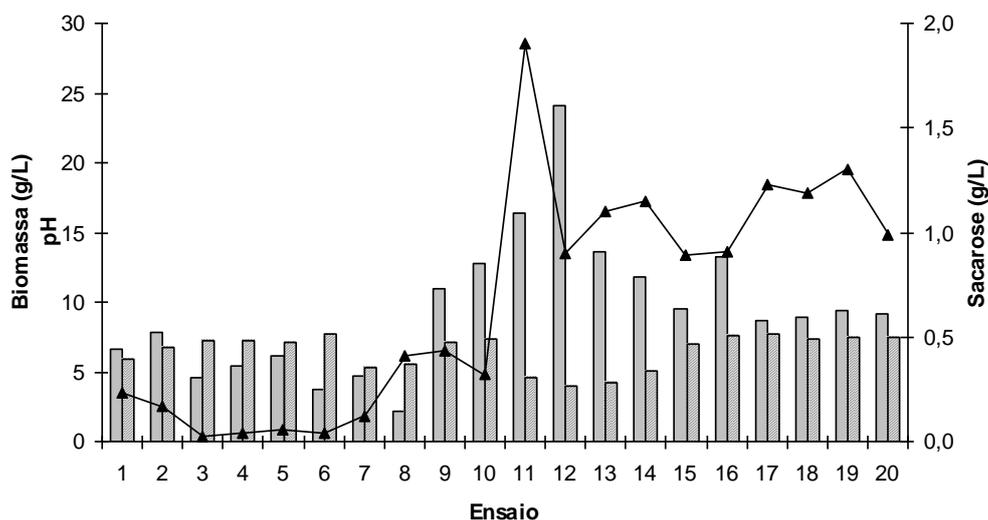


Figura 13. Biomassa (barra cinza), consumo de sacarose (▲) e pH (barras listradas) dos ensaios realizados no planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} .

Os ensaios 1, 2, 7 e 8, finalizados após 240 horas de cultivo, não apresentaram altos valores de biomassa; contudo, era esperada a obtenção de maiores concentrações celulares, pois este tempo localiza-se na fase exponencial de crescimento celular, de acordo com os resultados de cinética de crescimento com discos de micélio. Este comportamento provavelmente ocorreu devido à concentração de sacarose inicial (10 g/L) nestes ensaios não ser suficiente para promover o crescimento do micro-organismo. Esta consideração pode ser confirmada ao se analisar os ensaios com concentração inicial de sacarose de 50 g/L e mesmo tempo de cultivo, nos quais a concentração celular obtida foi mais elevada, com destaque para os ensaios 12 (24,10 g/L) e 11 (16,36 g/L). Ademais, em concentrações baixas de carbono, a relação C:N pode ter reduzido consideravelmente e o micro-organismo não pôde realizar o seu metabolismo de forma adequada.

Em relação ao consumo de sacarose, nos ensaios 3, 4, 5 e 6, obteve-se a menor concentração final de sacarose. Nestes ensaios, a concentração inicial de sacarose foi de 10 g/L, o que pode ter levado o micro-organismo a consumir esta fonte de carbono até a exaustão para se desenvolver eficientemente. Nos demais ensaios, o consumo de sacarose foi de acordo com o esperado, já que, no item 4.1.2.4, observou-se que, com 240 horas de cultivo, o micro-organismo já havia degradado praticamente toda esta fonte de carbono e estava realizando outras transformações de seu metabolismo.

Em todos os ensaios que tiveram tempo final de cultivo de 336 horas, o pH final foi próximo a 7,0, independentemente do pH inicial. O menor pH final foi obtido no ensaio 12 (3,92), no qual o tempo final de cultivo foi de 240 horas e o pH inicial de 7,5. Neste ensaio, também foi obtida a maior biomassa (24,10 g/L). Para os demais ensaios que tiveram tempo final de cultivo de 240 horas, o pH final variou entre 4,30 e 6,80, este último obtido no ensaio 2. O comportamento do pH para todos os ensaios está de acordo com o apresentado na curva de crescimento do *P. purpurogenum*, no qual o pH, nas primeiras horas do processo, decresce e, posteriormente, se eleva.

Baseando-se na análise dos resultados apresentados acima, quatro variáveis (concentração de extrato de levedura e de sacarose, pH e velocidade de agitação) foram selecionadas para serem avaliadas por planejamento fatorial fracionário. As outras variáveis foram fixadas em 336 horas de período de incubação e temperatura de 30° C.

3.4.2 Segundo planejamento fatorial fracionário para produzir colorantes naturais

O planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} é um método útil para avaliar o impacto das variáveis sobre as respostas e para definir as condições do planejamento fatorial seguinte. A Tabela 9 mostra os valores $-p$ para as respostas colorantes amarelos, laranjas e vermelhos.

Tabela 9. Análise de variância aplicada aos modelos de regressão usados para a produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos em função de pH, velocidade de agitação e concentração de sacarose e extrato de levedura, de acordo com planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Variável	Valor -p		
	Colorantes amarelos	Colorantes laranjas	Colorantes vermelhos
(1) pH	0,0715	0,6343	0,0933
(2) Velocidade de agitação (rpm)	0,0056*	0,0938	0,0021*
(3) Extrato de levedura (g/L)	0,0001*	0,0073*	0,00002*
(4) Sacarose (g/L)	0,0000*	0,0009*	0,0003*
1*2	0,0010*	0,0023*	0,0082*
1*3	0,0065*	0,0890	0,0002
1*4	0,0003*	0,1343	0,2019

*significante ao nível $p < 0,05$; $R^2 = 97\%$ (colorantes amarelos). $R^2 = 92\%$ (colorantes laranjas). $R^2 = 93\%$ (colorantes vermelhos).

A análise estatística dos resultados mostrou que, na faixa estudada, a produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos foi significativamente influenciada pela concentração do extrato de levedura e da sacarose. Além disso, a interação entre pH e velocidade de agitação (1*2) também mostrou efeito significativo para todas as respostas. A velocidade de agitação e as interações entre pH e extrato de levedura também tiveram efeito significativo para os colorantes amarelos e vermelhos. Ademais, a interação entre pH e concentração de sacarose foi significativa na produção de colorantes amarelos.

A falta de ajuste do modelo foi verificada pelo coeficiente de determinação R^2 , que foi calculado como 0,97, 0,92 e 0,93, para os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, respectivamente. Isto indica que 97, 92 e 93% da variabilidade poderia ser explicada pelo modelo para as respectivas respostas.

O efeito da interação entre as variáveis pH e velocidade de agitação foi negativo. Assim, uma destas variáveis deveria estar no menor nível enquanto a outra em maior nível para promover os melhores resultados. Então, quando o pH estava em seu menor nível (4,0) e a velocidade de agitação estava em seu maior nível (180 rpm), o maior efeito foi observado.

A maior produção dos colorantes foi obtida na maior concentração de extrato de levedura e no menor nível para o pH e a velocidade de agitação. Neste estudo, foi observado que o pH, apesar de ser significativo nas interações, pode ser considerado inerte, o que significa que esta variável independente não apresenta nenhum efeito nas variáveis respostas. Assim, o pH foi fixo em 4,5 nos experimentos seguintes, que representa o ponto central neste estudo.

A concentração de extrato de levedura e sacarose foi essencialmente significativa para as respostas no nível positivo, que significa que o aumento na sua concentração pode melhorar os resultados. A alta concentração de extrato de levedura promoveu o aumento na produção dos colorantes extracelulares, provavelmente devido a sua reação com grupos contendo o componente amina no meio para formar complexos solúveis em água (PASTRANA *et al.*, 1995).

Não somente a concentração de sacarose, mas também a concentração de extrato de levedura foi mantida para ser avaliada no planejamento fatorial seguinte. Como a velocidade de agitação foi significativa para duas respostas

(produção de colorantes amarelos e vermelhos), esta variável independente foi também estudada em um novo planejamento fatorial.

3.4.3 Planejamento fatorial completo

Depois da seleção das variáveis que influenciaram significativamente a produção de colorantes naturais por *P. purpurogenum* DPUA 1275, usando planejamento fracionário, as variáveis independentes velocidade de agitação, concentração de extrato de levedura e sacarose foram avaliadas sobre a produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, através de um planejamento fatorial completo 2^3 . A Figura 14 apresenta o gráfico de Pareto para as variáveis respostas colorantes amarelos, laranjas e vermelhos.

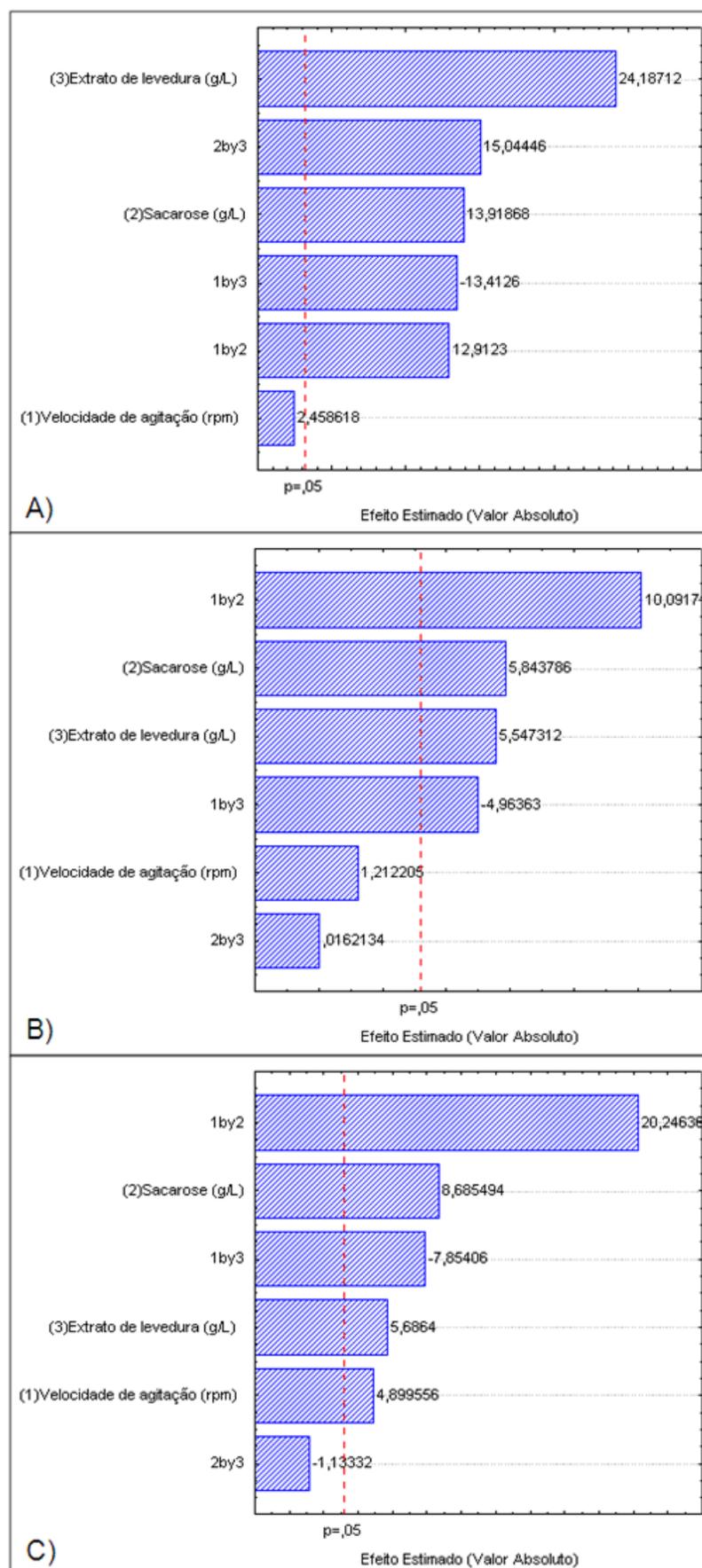


Figura 14. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a produção dos colorantes amarelos (A), laranjas (B) e vermelhos (C).

Para os colorantes amarelos (Figura 14A), as variáveis independentes significativas foram: concentração de extrato de levedura, interação entre a concentração de sacarose e o extrato de levedura (2^*3), concentração de sacarose, interação entre a velocidade de agitação e a concentração de sacarose (1^*2) e de extrato de levedura (3). Para estas respostas, somente o efeito da interação entre a velocidade de agitação e a concentração de extrato de levedura (1^*3) apresentou sinal negativo. Como a variável concentração de extrato de levedura apresentou sinal positivo, o melhor seria trabalhar com esta variável no nível superior, o que acarretaria em se trabalhar com a velocidade de agitação no nível inferior. Para esta resposta, o erro puro foi baixo (0,00097), com coeficiente de correlação de 0,9599, o que significa que 95,99% da variação total em torno da média são explicados pela regressão.

Para os colorantes laranjas (Figura 14B), foram significativas, ao processo, as variáveis independentes: a interação entre a velocidade de agitação e a sacarose, a concentração de sacarose e de extrato de levedura e a interação entre a velocidade de agitação e a concentração de extrato de levedura. Como obtido para os colorantes amarelos, a interação entre a velocidade de agitação e a concentração de extrato de levedura apresentou sinal negativo, diferentemente das demais variáveis, que apresentaram sinal positivo. Este resultado indica que quanto maior a concentração de extrato de levedura no meio, melhor será a produção. Para a interação entre a velocidade de agitação e a concentração de sacarose, as duas variáveis deveriam apresentar sinais iguais para que houvesse o melhor resultado.

Pela Figura 14C, pode-se observar que a interação entre a velocidade de agitação e a concentração de sacarose (1^*2) apresentou o maior efeito para a variável-resposta “colorantes vermelhos”, com um sinal positivo, indicando que estas duas variáveis devem apresentar níveis iguais (positivo ou negativo) para a obtenção dos melhores resultados. Todas as variáveis principais exerceram influência significativa na produção de colorantes vermelhos. A interação entre a velocidade de agitação e a concentração de extrato de levedura (1^*3) também exerceu efeito significativo ao processo, porém no nível inferior. Como a maior concentração de extrato de levedura proporciona o melhor resultado, a velocidade de agitação deve ser utilizada no nível inferior, assim, no planejamento seguinte, esta variável foi fixada no ponto central (150

rpm), o que poderia proporcionar a boa homogeneização do meio para não haver problemas de transferência de nutrientes durante o cultivo.

Analisando todos os resultados obtidos para as respostas estudadas, pode-se observar maior influência da concentração de extrato de levedura e da sacarose sobre a produção dos colorantes naturais, ambos no nível superior. Este resultado indica que as concentrações estudadas ainda não exerceram efeito de repressão catabólica no metabolismo do micro-organismo. Desta forma, estas duas variáveis foram analisadas através de um planejamento fatorial composto com 4 repetições no ponto central.

3.4.4 Planejamento fatorial composto central para produzir colorantes naturais

A partir dos planejamentos fatoriais apresentados acima, as concentrações de sacarose e de extrato de levedura foram as variáveis mais significativas na produção dos colorantes naturais por *P. purpurogenum* DPUA 1275. Estas variáveis foram, além disso, analisadas por um planejamento fatorial composto central com quatro repetições no ponto central, com a proposta de otimizar a produção destes metabólitos. Os resultados deste planejamento são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Matriz do planejamento 2^2 e as respostas Colorantes amarelos (UA_{400nm}), Colorantes laranjas (UA_{470nm}) e Colorantes vermelhos (UA_{490nm}).

Ensaio	Sacarose (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	Colorantes amarelos (UA_{400nm})	Colorantes laranjas (UA_{470nm})	Colorantes vermelhos (UA_{490nm})
1	50	8	1,785	1,204	1,009
2	50	10	3,095	2,495	2,040
3	60	8	2,164	1,668	1,572
4	60	10	2,339	2,036	1,785
5	48	9	2,066	1,268	1,255
6	62	9	2,052	1,681	1,560
7	55	7,6	2,422	1,922	1,804
8	55	10,4	3,135	2,254	2,034
9 (C)	55	9	2,196	1,348	1,166
10 (C)	55	9	1,974	1,573	1,441
11 (C)	55	9	2,073	1,379	1,300
12 (C)	55	9	2,150	1,473	1,415

A partir da Tabela 10, pode ser observado que a produção dos colorantes amarelos variou de 1,79 a 3,14 UA_{400nm}, a dos colorantes laranjas variou de 1,20 a 2,50 UA_{470nm} e a dos colorantes vermelhos foi de 1,10 a 2,04 UA_{490nm}. Para os colorantes amarelos, o maior resultado foi obtido no ensaio 8, no qual as concentrações de extrato de levedura e de sacarose foram de 10,4 e 55 g/L, respectivamente. Para os colorantes laranjas e vermelhos, a maior produção ocorreu no ensaio 2 (50 g/L de sacarose e 10 g/L de extrato de levedura). A produção de colorantes naturais obtida neste planejamento fatorial é superior aos resultados obtidos nos demais planejamentos fatoriais, o que demonstra que a condução do planejamento fatorial para aumentar a produção dos colorantes naturais foi satisfatória.

A Figura 15 mostra as superfícies de resposta, as quais indicam o efeito simultâneo para as variáveis independentes sobre as variáveis respostas colorantes amarelos, laranjas e vermelhos.

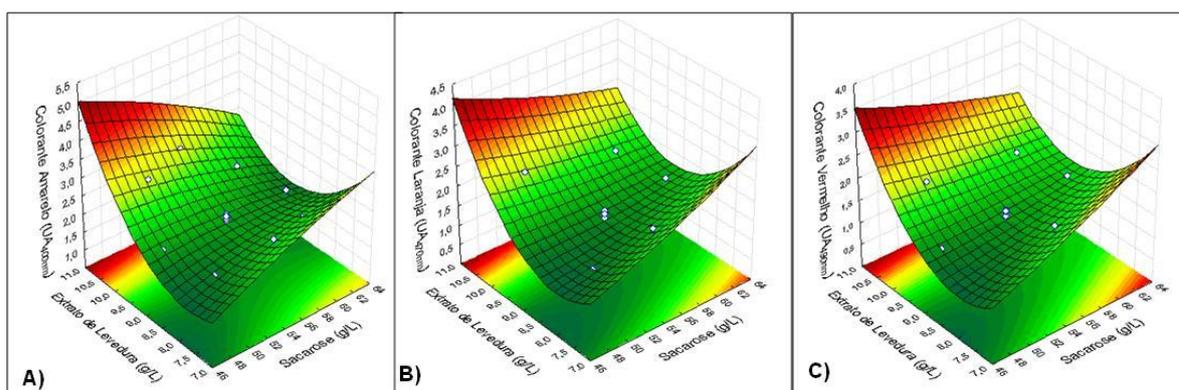


Figura 15. Superfície de resposta do planejamento experimental central composto para os colorantes amarelos (A), laranjas (B) e vermelhos (C).

De acordo com a Figura 15, pode ser observado que, para todas as respostas estudadas, há a possibilidade para melhorar a produção dos colorantes, variando as condições do cultivo submerso. A superfície de resposta indica que os melhores resultados seriam possíveis se maiores concentrações de sacarose e de extrato de levedura fossem usadas. A Tabela 11 mostra os valores de probabilidade para os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos. Para o valor- p , é possível determinar quais variáveis foram significantes ao processo. Como neste trabalho o nível de confiança de 95% foi considerado, as variáveis independentes com valores p menores do que 0,05 são consideradas significantes.

Tabela 11. Valores de p para as variáveis independentes na produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275.

Fonte de variação	Valor p - Colorantes amarelos	Valor p - Colorantes laranjas	Valor p - Colorantes vermelhos
(1) Sacarose (g/L) (L)	0,243554	0,133879	0,129119
Sacarose (g/L) (Q)	0,374487	0,486239	0,698317
(2) Extrato de Levedura (g/L) (L)	0,002839*	0,005012*	0,021401*
Extrato de Levedura (g/L) (Q)	0,003586*	0,003417*	0,011214*
1L*2L	0,010056*	0,019799*	0,047279*

*significativo ao nível de 95% de confiança; L = Linear; Q = Quadrático

Através dos resultados da análise estatística para as respostas colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, foi observado que o extrato de levedura, em termos linear e quadrático, teve efeito significativo. Além disso, a interação entre os termos lineares das variáveis também mostrou efeitos significantes para as respostas colorantes laranjas e vermelhos.

Baseados nos resultados de regressão completa, os seguintes modelos foram determinados para sacarose (x_1) e extrato de levedura (x_2) sobre a produção de colorantes amarelos (y_1), laranjas (y_2) e vermelhos (y_3), como descrito nas seguintes equações:

$$y_1 = 2,10 - 0,05x_1 - 0,04x_1^2 + 0,31x_2 + 0,32x_2^2 - 0,28x_1x_2 \quad \text{equação 7}$$

$$y_2 = 1,44 + 0,07x_1 + 0,03x_1^2 + 0,27x_2 + 0,35x_2^2 - 0,23x_1x_2 \quad \text{equação 8}$$

$$y_3 = 1,33 + 0,09x_1 + 0,02x_1^2 + 0,20x_2 + 0,28x_2^2 - 0,20x_1x_2 \quad \text{equação 9}$$

Então, de acordo com as equações acima, a produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos pode ser explorada e maximizada utilizando diferentes condições. Todavia, o ensaio 2 (50 g/L de sacarose e 10 g/L de extrato de levedura) pode ser selecionado como o melhor para a produção de colorantes, sendo capaz de assegurar, ao mesmo tempo, resultados satisfatórios para a produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos.

3.5 Conclusão

Os resultados obtidos a partir dos planejamentos fatoriais, que analisaram as variáveis independentes (tempo de incubação, velocidade de agitação, pH, temperatura e concentração de sacarose e extrato de levedura) sobre a produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, sugerem que as concentrações de sacarose e de extrato de levedura foram as variáveis mais significantes para o processo de obtenção de colorantes por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 e que a concentração ideal destes substratos é próxima a 50 e 12 g/L, respectivamente. Além disso, a nova cepa mostrou capacidade de ter sua produção de colorantes incrementada, podendo ser considerada uma fonte alternativa de colorantes naturais para aplicação industrial.

4. CAPÍTULO IV

Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability

Valéria Carvalho Santos-Ebinuma, Inês Conceição Roberto, Maria Francisca Simas Teixeira, Adalberto Pessoa Jr.

Este artigo foi submetido no periódico *Biotechnology Progress*, com fator de impacto igual a 2,34. Submissão em 5-Novembro-2012.

4.1 Resumo

Há interesse mundial no desenvolvimento de processos para a produção de colorantes a partir de fontes naturais, como os micro-organismos. O objetivo deste estudo foi otimizar a produção de colorantes naturais por *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 e avaliar o efeito de pH, temperatura, sais e polímeros na estabilidade destas biomoléculas. Inicialmente, realizou-se a otimização da produção dos colorantes vermelhos através de planejamento central composto. As variáveis independentes estudadas foram concentrações de sacarose e de extrato de levedura. Sob condições otimizadas (48,50 g/L de sacarose e 11,80 de extrato de levedura), houve incremento de 78% na produção dos colorantes. Em relação aos estudos de estabilidade, as melhores condições de pH e temperatura obtidas foram pH 8,0 e 70°C. Na presença dos sais NaCl e Na₂SO₄, a 0,1 e 0,5 M, os colorantes vermelhos mostraram boa estabilidade; além disso, os colorantes vermelhos mantiveram a intensidade da cor na presença dos polímeros Polietileno glicol (PEG) e Poliacrilato de sódio (NaPA).

Palavras-chave: colorantes vermelhos, fungos, cultivo submerso, estabilidade, polímeros.

4.2 Introdução

Recentemente, o uso de colorantes sintéticos em diversos segmentos industriais tem se reduzido, devido à sua toxicidade e aos seus efeitos carcinogênicos. Desta maneira, tanto a busca quanto a aplicação de novos colorantes naturais estão em ascensão (HAILEI *et al.*, 2011). Colorantes naturais podem ser extraídos de fontes naturais, como plantas, insetos (BOO *et al.*, 2012; DEVEOGLU *et al.*, 2012; UNAGUL *et al.*, 2005) e micro-organismos (CHO *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 2005; MÉNDEZ *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2005). A produção por micro-organismos é de grande interesse industrial, porque esses seres vivos apresentam rápido crescimento, podem apresentar alta produtividade e gerarem produto com disponibilidade durante todo o ano (JIANG *et al.*, 2005; MÉNDEZ *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2005). Além disso, colorantes microbianos são frequentemente mais estáveis e solúveis do que os produzidos por plantas e animais (GUNASEKARAN; POORNIAMMAL, 2008).

Entre os micro-organismos, fungos são reportados como potenciais produtores de substâncias colorantes (BABITHA *et al.*, 2007; VELMURUGAN *et al.*, 2010a). Os fungos podem produzir colorantes com estrutura química diversa das moléculas encontradas atualmente e podem abranger uma nova faixa de cores (MAPARI *et al.*, 2009)

Há relatos na literatura (HAILEI *et al.*, 2011; MAPARI *et al.*, 2008, 2010; MÉNDEZ *et al.*, 2011) de que cepas de *Penicillium* são potenciais produtores de colorantes naturais com estrutura policetídica e cromóforos similares aos colorantes de *Monascus* (MAPARI *et al.*, 2008). N-glutarylmonascorubramina e N-glutarilrubropuntacmina (Figura 16) são alguns dos colorantes de *Monascus* solúveis em água encontrados no meio líquido de *P. purpurogenum* (MAPARI, S. A. *et al.*, 2009). A estrutura dos policetídeos é conhecida por não apresentar íons carregados negativamente localizados. Estas moléculas frequentemente contêm funcionalidade poli-insaturada, ou seja, sistema de anéis, um ou mais grupos carbonila, ácido carbólico e grupo funcional éster ou amida exibindo características no espectro UV-visível.

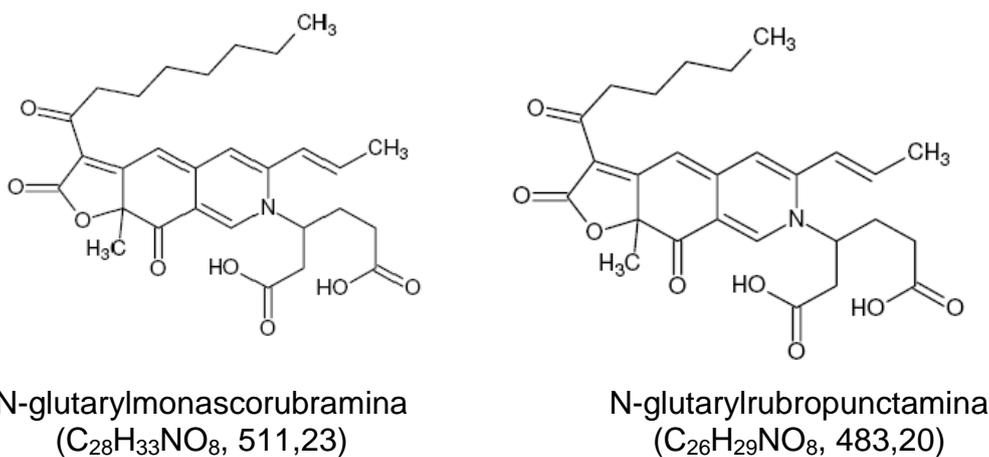


Figura 16. Estrutura química dos colorantes vermelhos produzidos por *Monascus* FONTE: Mapari *et al.* (2009).

A produção de biomoléculas por micro-organismos está relacionada às condições do bioprocesso. Encontrar a melhor forma de condução do processo e definir as concentrações dos nutrientes são fatores que contribuem não somente para a redução do custo de produção, mas também para o aumento da produtividade da molécula de interesse. Visando ambos os objetivos, planejamentos experimentais vêm sendo empregados para otimizar uma vasta gama de bioprocessos (CHANG *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2002; GUNASEKARAN; POORNIAMMAL, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2012). Através do planejamento fatorial, é possível reduzir o número de experimentos e avaliar as variáveis significativas juntamente com seus efeitos (BRUNS; SCARMINIO, 2006). Ademais, juntamente com a ferramenta estatística, pode-se utilizar da metodologia de superfície de resposta (MSR), que é usualmente construída para os fatores definidos de um meio por equação polinomial quadrática para descrever os efeitos de interação entre as variáveis e otimizar o bioprocesso (ZAFAR *et al.*, 2012).

Em termos de aplicação de colorante natural nas indústrias farmacêutica e alimentícia, é necessário conhecimento detalhado da estabilidade destas biomoléculas contra possíveis processos de degradação, em ordem de otimizar a produção industrial e os processos de embalagem e estocagem de produtos coloridos (JESPERSEN *et al.*, 2005). Desta maneira, há mercado para a descoberta de colorantes naturais mais estáveis, os quais podem ter ampla aplicação industrial sem se utilizar técnicas de formulação (MAPARI *et al.*, 2009). Diante do exposto e tendo conhecimento que há pouca informação a

respeito da perda de colorantes vermelhos durante o aquecimento e sobre a influência de fatores e mecanismos de degradação, este trabalho tem como objetivo otimizar a produção dos colorantes vermelhos por cultivo submerso e avaliar o efeito de diferentes níveis de pH, temperaturas, sais e polímeros em função do tempo sobre essas biomoléculas.

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Reagentes

Sacarose e extrato de levedura foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brazil) e Acumedia (Lansing, Michigan, USA), respectivamente. Polietileno glicol de massa molar 1.000 e 6.000 g/mol foram adquiridos da Merck®. Polietileno glicol de massa molar 10.000 g/mol, Poliacrilato de Sódio de massa molar 8.000 g/mol a 45% p/v foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

As soluções foram preparadas em tampão Mcllvaine, composto de fosfato de sódio dibásico e ácido cítrico em uma faixa de pH de 3,0 a 8,0, e em tampão Carbonato/Bicarbonato de Sódio 0,2 M nas faixas de pH 9,0 e 10,0. O tampão Mcllvaine foi composto de fosfato de sódio dibásico e ácido cítrico. Água deionizada por sistema de purificação de água Millipore® (Bedford, MA, USA) foi utilizada em todo o trabalho.

4.3.2 Manutenção do micro-organismo, cultivo submerso e meio de cultivo

A cepa de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 foi cedida pela Coleção de Culturas DPUA, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, AM, Brasil. A cultura estoque foi mantida em tubos inclinados contendo meio de cultura Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA). Tubos e placas foram inoculados a 25 °C, por sete dias. Para a manutenção das culturas de *P. purpurogenum*, estas foram mantidas em tubos inclinados contendo meio CYA, incubados a 25°C, por sete dias, e conservados em geladeira a 4°C, sendo repicados a cada 30 dias.

O inóculo foi realizado em placa CYA com a seguinte composição (g/L água deionizada): K₂HPO₄ (1,0), extrato de levedura (5,0), sacarose (30,0),

Ágar (15,0) e 10 ml/L de Czapeck concentrado [NaNO_3 (30,0 g), KCl (5,0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), água deionizada q.s.p. 100 mL] (PITT, 1985).

Para o cultivo submerso, 5 discos de micélio (8 mm de diâmetro) do inóculo foram transferidos para frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL do meio de cultivo e incubados em *orbital shaker* a 30 °C e 150 rpm, por 336 horas. A composição do meio de cultivo submerso foi similar à utilizada no inóculo, exceto em relação à concentração de sacarose e à concentração de extrato de levedura, que variaram de acordo com o planejamento experimental. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 4,5 com HCl (5 M) e foram autoclavados a 121 °C, por 15 minutos.

Após o término do cultivo submerso, o meio fermentado foi filtrado em papel de filtro Whatman n°1 (Whatman, England) e em membrana Millipore 0,45 μm . O filtrado obtido, contendo os colorantes vermelhos, foi congelado a -70°C para ser utilizado nos ensaios de estabilidade.

4.3.3 Planejamento fatorial

A influência das variáveis independentes: concentração de sacarose e extrato de levedura sobre a produção dos colorantes vermelhos foi estudada através de planejamento composto central 2^2 , com total de 12 experimentos. Os níveis e os fatores dos componentes estudados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Níveis dos fatores utilizados no primeiro e no segundo planejamentos centrais compostos do tipo 2^2 no estudo das melhores condições de cultivo para a produção de colorantes naturais por *P. purpurogenum* DPUA 1275.

Fatores	Níveis				
	Axial (- 1,68)	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+ 1)	Axial (+ 1,68)
Sacarose (g/L)	33,2	50	55	60	66,8
Extrato de levedura (g/L)	8,64	10	12	14	15,36

Para elaboração estatística, os valores reais de cada variável independente (X_i) foram codificados de acordo com a equação:

$$x_i = \frac{X_i - X_o}{\Delta X_i} \quad \text{equação 10}$$

em que x_i representa o valor codificados correspondentes, X_o , o valor real do ponto central e ΔX_i , o valor de cada passo.

Para identificar as melhores condições para a produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, um modelo quadrático expresso pela equação 2 foi usado:

$$\hat{y}_i = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_i x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad \text{equação 11}$$

em que \hat{y}_i são os valores previstos para cada resposta, b_0 e b_i a intercepção e os coeficientes lineares e quadráticos, respectivamente, e b_{ij} suas interações.

A versão estatística 7,0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) foi usada para regressão e análise gráfica dos dados. A significância estatística dos coeficientes de regressão foi determinada pelo teste de Fischer, para análise da variância (ANOVA), em nível de significância (p) $\leq 0,05$. A extensão da variância explicada pelo modelo foi dada pela determinação do coeficiente de determinação R^2 . Para minimizar o erro de ANOVA, os correspondentes testes foram realizados em quadruplicata no ponto central. Os experimentos e os valores previstos foram comparados em ordem de determinar a validade dos modelos.

4.3.4 Característica dos colorantes vermelhos

Todos os testes de estabilidade foram realizados pela mistura do meio fermentado contendo os colorantes vermelhos com o tampão no desejado pH (colorantes vermelhos:tampão = 1:1). O meio fermentado usado foi o obtido na melhor condição gerada pelo planejamento fatorial. Todas as soluções continham a absorbância inicial dos colorantes vermelhos em 2,00 UA_{490nm} (depois de considerável fator de diluição).

Após a preparação das soluções, estas foram homogeneizadas em agitador orbital (Barnstead/Thermolyne, modelo 400110) a 8 rpm, por 5

minutos, à temperatura ambiente, e mantidas em banho termorregulável (Nova Ética, 521/2DE) na temperatura de interesse.

A primeira série de experimentos foi realizada para avaliar o efeito do pH (3,0 - 10,0) na cor dos colorantes vermelhos a 25°C. Na segunda parte, a estabilidade dos colorantes em diferentes temperaturas foi determinada pela incubação a 25, 30 – 90 °C, por 24 horas, em pH 8,0. Em ambos os experimentos, amostras foram retiradas nos tempos de 0, 1, 3, 6, 9 e 24 horas. Finalmente, o efeito dos sais NaCl e Na₂SO₄, nas concentrações de 0,1 e 0,5 M, sobre a mudança da coloração vermelha dos colorantes vermelhos foi avaliado a 0, 1, 3 e 6 horas.

Durante o intervalo de tempo requerido para cada experimento, alíquotas das soluções foram retiradas, a absorvância dos colorantes vermelhos foi determinada e a mudança da absorvância da cor foi avaliada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados. O limite de significância para análise estatística resultou no intervalo de confiança de 95%.

4.3.5 Interação entre os colorantes vermelhos e os polímeros

A interação entre os colorantes vermelhos e os polímeros foi avaliada pela medida da absorvância de suas misturas. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: 5 mL da solução polimérica (PEG 1.000, PEG 6.000, PEG 10.000 e NaPA 8.000 g/mol), nas concentrações de 5 e 15% p/p foi misturado com certo volume de meio de cultivo fermentado, de forma a se obter a absorvância final de 2,00 UA_{490nm}. As soluções foram homogeneizadas em cubeta, seladas com filme plástico e inseridas em banho termorregulado a 25°C. A absorvância foi determinada a 0, 1 e 3 horas.

4.3.6 Métodos analíticos

Os colorantes vermelhos foram estimados por análise espectrofotométrica pela leitura da absorvância a 490 nm, que corresponde à máxima absorvância para os colorantes vermelhos (JOHNS; STUART, 1991). Para determinar o comprimento de onda de absorvância máxima dos colorantes vermelhos, o meio fermentado foi varrido na faixa de 220 a 600nm

em cubeta de 1 cm à temperatura ambiente. Então, a absorvância dos colorantes vermelhos foi fixada a 490 nm.

A mudança da cor foi representada em termos de resíduo dos colorantes vermelhos (RCV), o qual foi definido como a relação entre a absorvância dos colorantes vermelhos depois (Abs_{AT}) e antes do tratamento (Abs_{BT}). Este parâmetro foi calculado como se segue:

$$RCV(\%) = \frac{Abs_{AT}}{Abs_{BT}} \times 100 \quad \text{equação 12}$$

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Planejamento estatístico central composto

Em trabalho anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, as concentrações de sacarose e de extrato de levedura se mostraram como as variáveis mais significativas para a produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos. Considerando que nos mais diversos segmentos industriais há grande interesse por colorantes vermelhos e estes são os mais estudados na literatura (CARVALHO *et al.*, 2005; CHEN; JOHNS, 1993; CHO *et al.*, 2002a; FABRE *et al.*, 1993; GUNASEKARAN; POORNIAMMAL, 2008; HAILEI *et al.*, 2011, 2012; KONGRUANG, 2011; LIAN *et al.*, 2007; MAPARI *et al.*, 2010; MEINICKE *et al.*, 2012; MUKHERJEE; SINGH, 2011; MÉNDEZ *et al.*, 2011; PAN *et al.*, 2009), este trabalho focou na otimização da produção e na caracterização destes colorantes.

Desta maneira, para se alcançar a área ótima de trabalho para a obtenção da máxima concentração destes metabólitos, realizou-se um planejamento estatístico central composto, avaliando como variáveis independentes a concentração de sacarose (fonte de carbono) e de extrato de levedura (fonte de nitrogênio). Este planejamento continha uma matriz fatorial inserida com pontos centrais e pontos de estrela para permitir a estimativa da curvatura (CHEN *et al.*, 2002). Uma unidade foi designada como a distância do centro do espaço do planejamento estatístico para pontos equidistantes, enquanto a unidade de α foi designada como a distância do centro do espaço a um ponto de estrela. Os pontos de estrela representam novos valores extremos (mais alto e mais baixo) para cada variável do planejamento, então $\alpha = [2k]^{1/2,7}$

e, neste estudo $k = 2$ variáveis (concentração de extrato de levedura e sacarose). O α utilizado foi de 1,68. A Tabela 13 mostra os resultados obtidos para cada condição experimental.

Tabela 13. Matriz do planejamento 2^2 e as respostas colorantes amarelos (UA_{400nm}), colorantes laranjas (UA_{470nm}) e colorantes vermelhos (UA_{490nm}).

Ensaio	Sacarose (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	Colorantes amarelos (UA_{400nm})	Colorantes laranjas (UA_{470nm})	Colorantes vermelhos (UA_{490nm})
1	40	10	3,45	2,67	2,501
2	60	10	2,43	1,98	1,635
3	40	14	2,95	2,31	2,208
4	60	14	3,12	2,48	2,276
5	33,2	12	2,4	1,92	1,769
6	66,8	12	2,54	1,89	1,611
7	50	8,64	2,43	1,97	2,058
8	50	15,36	2,4	1,76	1,605
9	50	12	3,737	3,056	2,953
10	50	12	3,812	3,034	2,956
11	50	12	3,840	3,077	2,964
12	50	12	3,735	3,014	2,945

As maiores absorvâncias foram obtidas no ponto central (50 g/L de sacarose e 12 g/L de extrato de levedura), com média de 2,955 UA_{490nm} para os colorantes vermelhos. Em trabalhos anteriores, o meio CYA foi utilizado como meio base para os experimentos. No referido meio, as concentrações de sacarose e extrato de levedura eram de 30 e 5 g/L, respectivamente, com pH inicial do meio de cultivo de 6,5; as demais condições experimentais eram: 30 °C e 336 horas de cultivo. Nas condições citadas, a produção de colorantes vermelhos foi 1,052 UA_{490nm} . Desta maneira, após a otimização da concentração das fontes de carbono e nitrogênio e de iniciar o cultivo submerso no pH de 4,5, houve incremento de 180% na produção dos colorantes vermelhos. Uma possível explicação para este resultado é que o aumento da concentração de ambas as fontes nutricionais promoveu maior crescimento celular e, em relação ao extrato de levedura, a concentração superior deste nutriente gerou maior quantidade de reações com grupos contendo componente amina no meio, formando complexos solúveis em água, ou seja, os colorantes vermelhos. Maiores concentrações das fontes nutricionais não

geraram produção superior, provavelmente devido a uma repressão catabólica pelo micro-organismo.

A Figura 17 apresenta o gráfico do consumo de sacarose, pH, biomassa e produção dos colorantes vermelhos em função do tempo para cada condição do planejamento experimental.

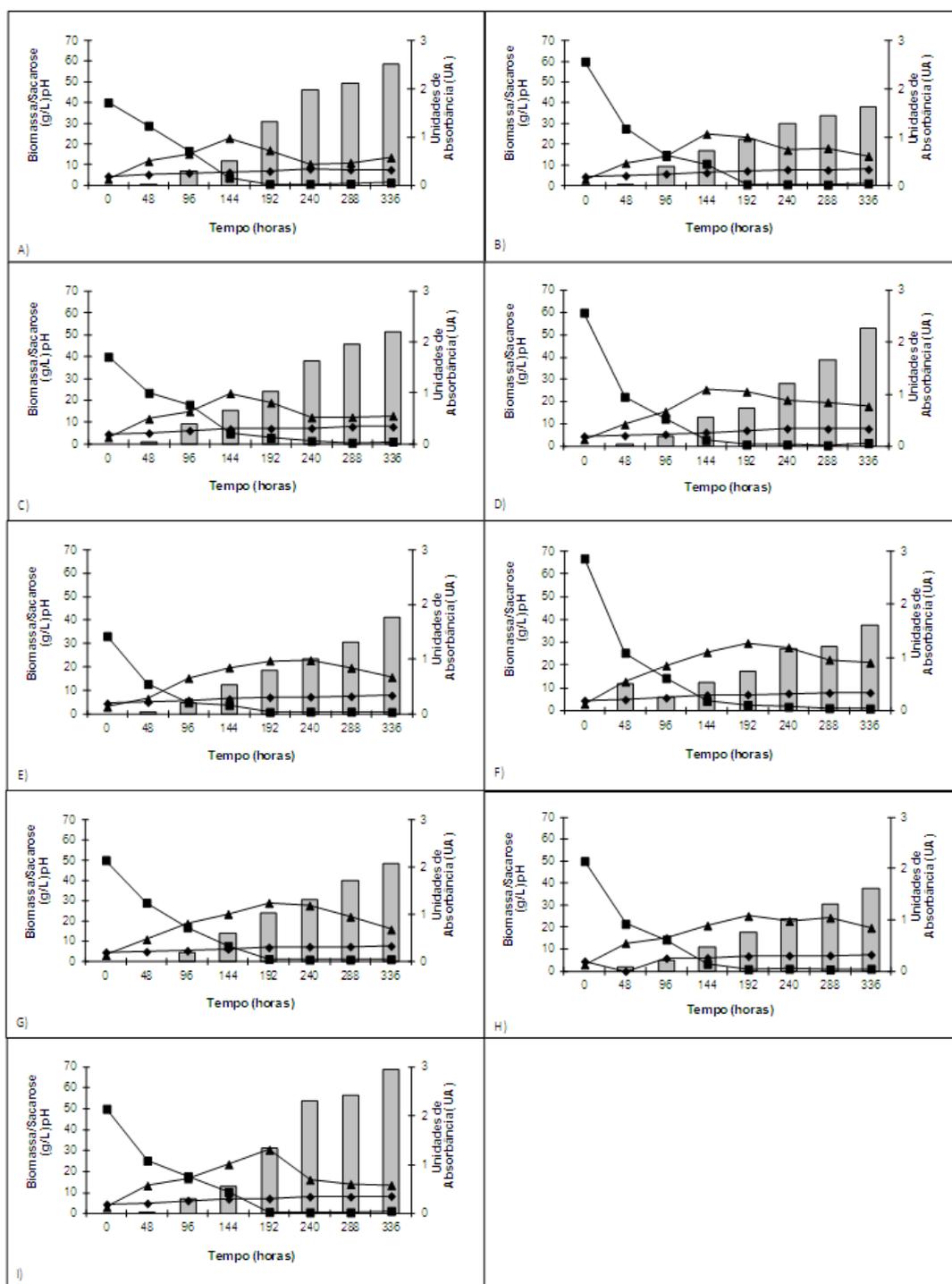


Figura 17. Biomassa (▲), consumo de sacarose (■), pH (◆) e produção de colorantes vermelhos (barras cinzas, UA_{490nm}) para os ensaios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H) e ponto central (I) do planejamento fatorial central composto 2².

A Figura 17 mostra que em todos os experimentos a sacarose, independentemente de sua concentração inicial, chegou à exaustão com 192 horas de cultivo submerso, mostra também que, neste tempo, a biomassa já havia atingido o seu pico e que, após este tempo, o micro-organismo estava entrando na fase de morte celular. A maior produção dos colorantes vermelhos ocorreu no tempo final do processo (336 horas), o que demonstra a característica de metabólito secundário destes colorantes. Através da Figura 17, também é possível visualizar o efeito da repressão catabólica pelos nutrientes do meio. O gráfico H mostra a condição experimental na qual a concentração de sacarose foi de 50 g/L e a de extrato de levedura de 15,36 g/L. Comparando os resultados desta condição experimental com a do ponto central (50 g/L de sacarose e 12 g/L de extrato de levedura), a produção de colorantes vermelhos foi 1,87 vezes superior na segunda condição e o aumento da concentração de extrato de levedura também promoveu baixo crescimento celular comparado com as demais condições. Resultado similar ocorreu com maiores concentrações de sacarose, ou seja, não somente a produção de colorantes foi prejudicada, mas também a produção de biomassa.

A Figura 18 mostra os efeitos simultâneos, evidenciados pela metodologia de superfície de resposta (MSR), da concentração de sacarose (x_1) e de extrato de levedura (x_2) sobre a produção de colorantes vermelhos (y_1), descritos pela equação:

$$y_1 = 2,963 - 0,110x_1 - 0,444x_1^2 - 0,043x_2 - 0,394x_2^2 + 0,234x_1x_2 \quad \text{equação 13}$$

O modelo prevê uma resposta máxima para os colorantes vermelhos, o modelo prevê absorvância máxima de 2,97 UA_{490nm}, ao se trabalhar com 48,50 g/L de sacarose e 11,80 de extrato de levedura. A análise estatística indicou que o modelo proposto foi adequado, com valores de coeficiente de regressão (R^2) de 0,94997. Sabe-se que quanto mais próximo de 1 for o R^2 melhor é o ajuste de modelos empíricos aos dados. O erro puro obtido para todas as variáveis respostas foi inferior a 0,003.

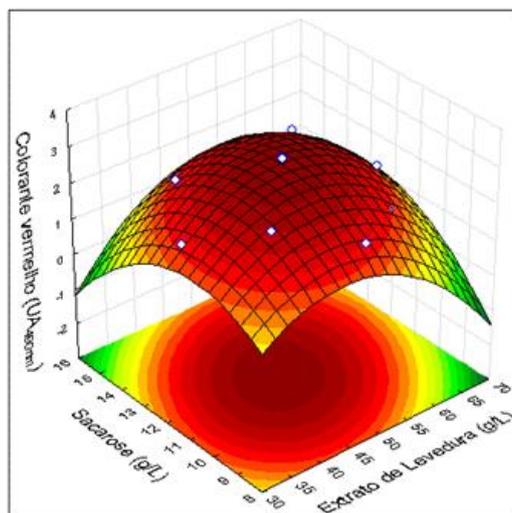


Figura 18. Superfície de resposta do planejamento fatorial central composto 2^2 para a variável-resposta colorantes vermelhos.

Uma vez que colorantes extracelulares produzidos por *P. purpurogenum* são metabólitos secundários, estas concentrações de sacarose e de extrato de levedura são necessárias para aumentar a produção dos metabólitos primários, que são os precursores dos metabólitos secundários e do crescimento e do metabolismo do micro-organismo.

As condições ótimas para a produção dos colorantes vermelhos por *P. purpurogenum* DPUA1275, como previsto pelo planejamento fatorial central composto, foram conferidas experimentalmente. Os resultados de absorvância obtida ($3,19 \pm 0,12$) tiveram boa correlação (próximo a 90%) com os previstos pelo modelo (2,97), confirmando a eficiência da estratégia estatística utilizada.

4.5 Caracterização parcial dos colorantes vermelhos

A estabilidade de uma biomolécula é um dos fatores que influenciam significativamente, não somente o seu processo de extração, mas também a sua aplicação. Em muitos casos, a estabilidade ao aquecimento, à luz e ao pH limita a aplicação dos colorantes naturais em uma faixa de processos industriais (MAPARI *et al.*, 2009). Desta maneira, antes de submeter os colorantes vermelhos produzidos por cultivo submerso de *P. purpurogenum* ao processo de extração ou ensaios de aplicabilidade, sua estabilidade em diferentes condições foi avaliada.

4.6 Efeito do pH na estabilidade dos colorantes vermelhos

O efeito do pH ($3,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$) na estabilidade dos colorantes está apresentado na Figura 19.

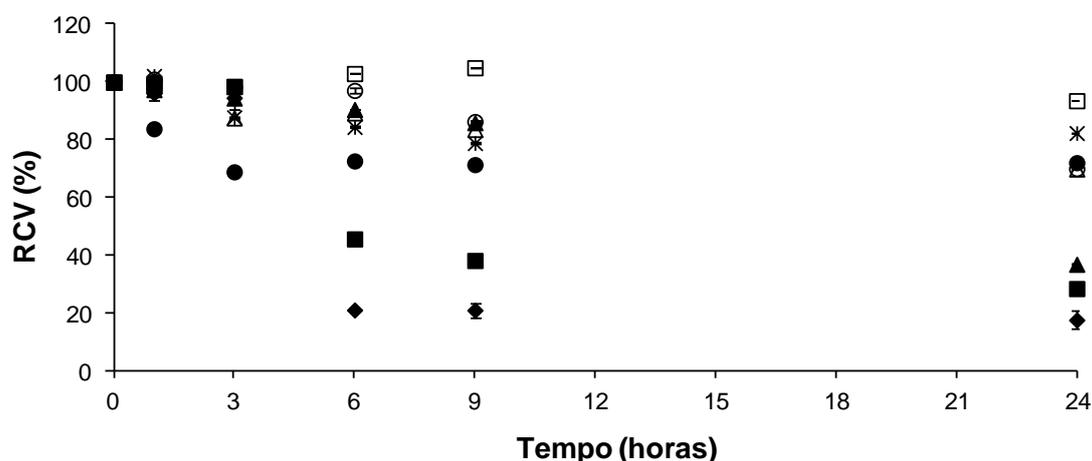


Figura 19. Estabilidade dos colorantes vermelhos a diferentes níveis de pH (◆-pH 3,0; ■-pH 4,0; ▲-pH 5,0; ●-pH 6,0; *-pH 7,0; □-pH 8,0; ○-pH 9,0; Δ-pH 10,0) em função do tempo. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. Todos os ensaios foram determinados a 25°C.

Pode ser observado, a partir da Figura 19, que a perda da cor pelos colorantes vermelhos foi mais pronunciada nos níveis de pH ácidos (3,0 e 4,0) e depois de 3 horas de incubação. Em particular, depois de 24 horas de incubação, a porcentagem residual dos colorantes vermelhos foi de 17 e 28% para os níveis de pH 3,0 e 4,0, respectivamente. Para o pH 5,0, a perda da cor não foi tão intensa em comparação com as demais condições ácidas. A perda dos colorantes vermelhos próxima a 14 e 63%, após 9 e 24 horas de incubação, foi observada.

Para os níveis de pH 6,0, 9,0 e 10,0, a estabilidade da cor *versus* o pH foi próxima a 72%, depois de 24 horas. Em condições neutras (pH 7,0), a cor dos colorantes vermelhos mostrou boa estabilidade, próxima a 80% depois de 24 horas. O pH que promoveu a maior estabilidade dos colorantes, permanecendo 91% da cor após 24 horas de incubação, foi o pH 8,0. Levando em consideração que a melhor estabilidade foi obtida em níveis de pH alcalinos, em comparação aos níveis de pH 3,0, 4,0 e 5,0, pode-se hipotetizar que uma degradação catalisada a ácidos para os colorantes vermelhos foi mais pronunciada do que em condições alcalinas. É importante ressaltar que a estrutura química principal dos colorantes vermelhos ainda não foi elucidada e

nós assumimos que estas biomoléculas contêm estrutura similar a N-glutarilmonascorubramina e N-glutarilrubropunctamina, como apresentado na Figura 16.

Estes resultados estão em boa concordância com os resultados dos colorantes naturais produzidos por espécie de fungos *Monascus*, que são os colorantes mais encontrados na literatura. Fabre *et al.* (1993) estudaram a estabilidade de pigmentos produzidos por *Monascus ruber* e obtiveram que esses são mais estáveis em pH básico ou neutro. Esses autores testaram os pigmentos vermelhos em molhos ou patês coloridos e verificaram que os pigmentos apresentam cor residual de 92 a 98%, após três meses a 4°C, com boa aceitação sensorial.

Carvalho *et al.* (2005) estudaram a variação da cor em várias amostras de pigmento vermelho obtido por fermentação em estado sólido de *Monascus*. A condição analisada foi em níveis de pH variando de 4,1 a 7,9, a 100°C; com 3 horas de estudo, os autores observaram que nos menores valores pH a queda na coloração foi mais intensa. Os autores explicaram que o efeito do pH pode ser devido à aceleração de interações com as moléculas de pigmentos, como, por exemplo, o rompimento de uma ligação éster como a existente nos pigmentos de *Monascus*: rubropunctamina ou monascorubramina.

Mapari *et al.* (2009) estudaram a fotoestabilidade do pigmento fúngico produzido pelos fungos *Penicillium aculeatum* IBT 14263 e *Epicoccum nigrum* IBT 41028 em tampão citrato em níveis de pH ácidos e neutros. As análises qualitativa e quantitativa da mudança da cor dos extratos de pigmentos fúngicos mostraram melhor fotoestabilidade dos extratos fúngicos quando comparados aos padrões utilizados (*Monascus* RED e amarelo tumérico). A magnitude da descoloração, tanto para os sistemas formados por *P. aculeatum* quanto para *E. nigrum*, foi superior a pH 5,0 do que a pH 7,0.

Dessa maneira, os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com os obtidos por diversos autores (CARVALHO *et al.*, 2005; FABRE *et al.*, 1993; MAPARI *et al.*, 2009; SERRA *et al.*, 2007), nos quais os colorantes foram mais estáveis a valores de pH básicos e neutros. A quebra da ligação éster na molécula pode ser responsável pela perda da estabilidade dos colorantes em ambientes ácidos (MAPARI *et al.*, 2009). Devido ao meio fermentado de *P. purpurogenum* contendo o complexo colorante ter

apresentado melhor estabilidade em pH 8,0, este foi selecionado como o pH a ser utilizado nos demais ensaios de estabilidade.

4.6.1 Efeito da temperatura na estabilidade dos colorantes vermelhos

O efeito da temperatura sobre os colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* DPUA 1275 foi avaliado e os resultados são apresentados na Figura 20.

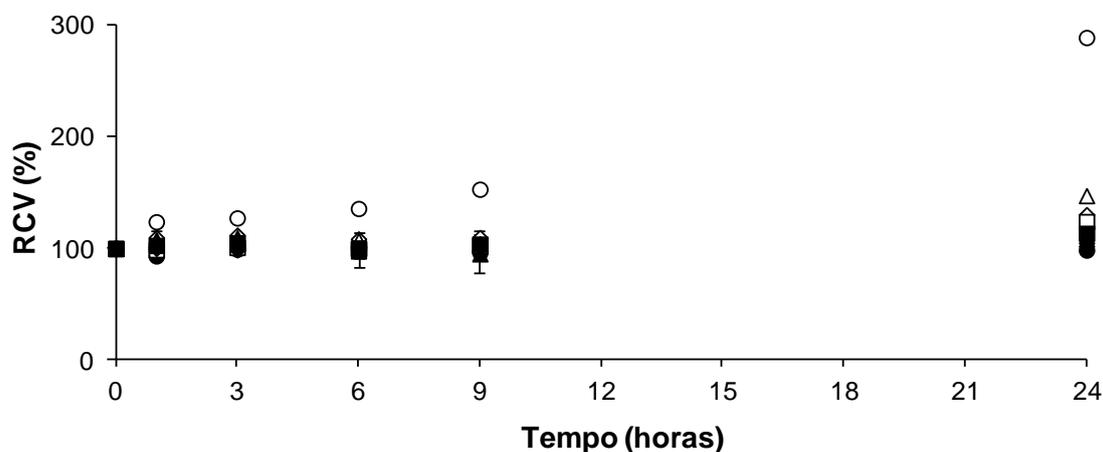


Figura 20. Estabilidade dos colorantes vermelhos a diferentes temperaturas (◆-25°C; ■-30°C; ▲-40°C; ●-50°C; ◇-60°C; □-70°C; △-80°C; ○-90°C) em função do tempo. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Para as temperaturas nas faixas de 25 a 50 °C, a cor residual dos colorantes vermelhos foi próxima a 100%, indicando que estas temperaturas favoreceram a preservação da cor vermelha. Nas temperaturas de 60 e 70°C, depois de 24 horas de incubação, a intensidade da cor foi aproximadamente 2 vezes superior do que 25 °C em ambas as condições.

A 80 e 90 °C, o aumento da intensidade da cor foi mais pronunciado, principalmente a 90 °C. A 80°C, o acréscimo próximo a 47% na intensidade da cor foi observado. Todavia, a 90°C este comportamento foi observado após 1 hora de incubação, com absorvância 1,3 vezes maior do que a obtida no tempo inicial, alcançando a intensificação próxima a 189%, como pode ser observado na Figura 20.

A intensificação da cor dos colorantes vermelhos devido à temperatura pode ser resultado de um efeito similar ao que ocorre durante o processo de caramelização do açúcar. A caramelização do açúcar ocorre devido à

degradação dos açúcares na ausência de aminoácidos ou proteínas e envolve reações de hidrólise, degradação, eliminação e condensação.

Carvalho *et al.* (2005) estudaram a estabilidade dos colorantes obtidos a partir de *Monascus* frente às temperaturas: 0, 40, 60 e 100°C. De acordo com estes autores, o efeito da temperatura é similar ao efeito em outras degradações térmicas, embora um modelo de Arrhenius (de decaimento exponencial) não represente bem o sistema. Isso se deve, possivelmente, ao fato de que o extrato é uma mistura de substâncias colorantes, cuja degradação pode se dar a diferentes velocidades e temperaturas.

Considerando futura aplicação destes biocolorantes em indústrias alimentícias, sua cor pode ser mantida durante o processo de pasteurização em produtos neutros e/ou alcalinos. Na indústria do processamento do couro, a temperatura usada é 70°C, por 120 minutos (VELMURUGAN *et al.*, 2010a), condições em que colorantes vermelhos estudados apresentam boa estabilidade.

Uma comparação dos resultados do efeito do pH e da temperatura na estabilidade dos colorantes vermelhos permite dizer que há maior influência do pH em comparação à temperatura, visto que, em extremos valores de pH, a perda de coloração é mais pronunciada do que quando há variação da temperatura. Cada influência pode ser causada pela presença de sistema de anéis na estrutura dos biocolorantes, que é susceptível ao ataque de íons, especialmente, ânions.

4.6.2 Estabilidade dos colorantes vermelhos em diferentes tipos e concentrações de sais

Os sais e as suas concentrações usadas nestes experimentos foram selecionados de acordo com a sugestão da literatura para sistemas poliméricos de duas fases aquosas (JOHANSSON *et al.*, 2008a), uma vez que estes sistemas serão utilizados como um método alternativo para a extração de colorantes naturais do meio fermentado em futuras investigações. Além disso, estes experimentos foram realizados com um tampão composto de citrato, que é um preservativo comumente aplicado a produtos alimentícios (MAPARI *et al.*, 2009).

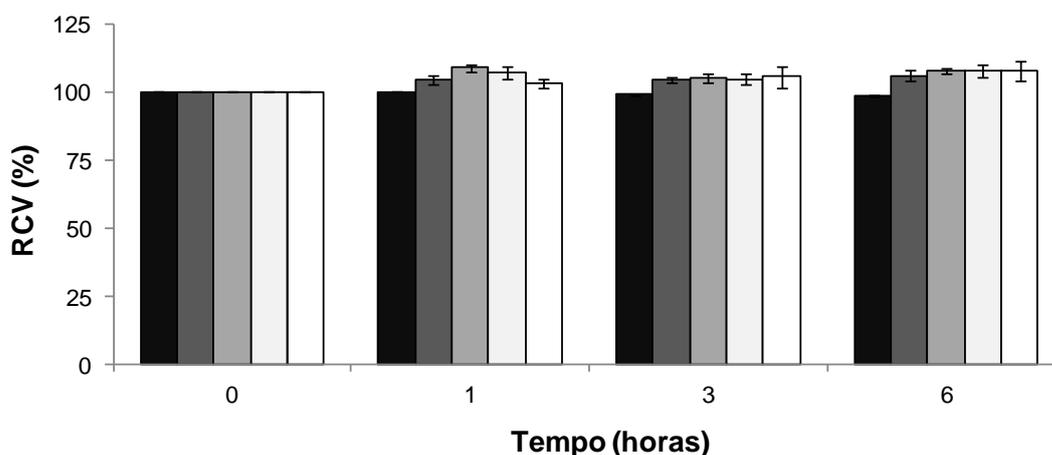


Figura 21. Estabilidade dos colorantes vermelhos a diferentes tipos e concentrações de sais [sem suplementação (■), NaCl 0,1M (■), NaCl 0,5M (■), Na₂SO₄ 0,1M (□) e Na₂SO₄ 0,5M (□)].

A Figura 21 ilustra os resultados dos sais NaCl e Na₂SO₄ depois de 1, 3 e 6 horas de uso, a concentrações de 0,1 e 0,5 M, que são comparados aos obtidos com tampão McIlvaine sozinho. Os resultados mostraram que a suplementação de diferentes sais a altas (0,5 M) ou baixas (0,1 M) concentrações não afetou a estabilidade da cor. Ademais, é interessante que, para todos os sais estudados, a intensidade da cor aumentou com o tempo. Na indústria de alimentos, sais de cloreto e sulfato são usados como estabilizantes e podem ter efeito similar sobre os colorantes vermelhos. Além disso, a presença de cátions de Na⁺ e ânions de Cl⁻ e SO₄⁻² possivelmente promoveu maior estabilidade da cor em comparação à condição padrão (sem suplementação de sais).

Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Hailei *et al.* (2011), que avaliaram a estabilidade da cor dos colorantes naturais vermelhos produzidos por *Penicillium sp.* HSD07B frente a diferentes substâncias químicas. Carvalho *et al.* (2005) realizaram um estudo de estabilização de pigmentos produzidos por *Monascus*, adicionando ao meio fermentado uma série de soluções a pH 7,0 de diferentes solutos, como o antioxidante ácido ascórbico, os sais oxidantes de Fe³⁺ e Cu²⁺ e a peptona (para providenciar grupos amino complexos, presentes em proteínas). Porém, nenhum desses fatores contribuiu apreciavelmente para a estabilização dos pigmentos.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que NaCl e Na₂SO₄ não causam perda de cor dos colorantes vermelhos. Ao contrário, estes sais ajudam na estabilidade destas substâncias.

4.6.3 Interação dos colorantes vermelhos a diferentes tipos e concentrações de polímeros

A estabilidade dos colorantes vermelhos foi avaliada contra PEG 1.000, 6.000 e 10.000 g/mol e NaPA 8.000 g/mol. Ambos os polímeros foram estudados a 5 e 15% (p/p). A estabilidade contra PEG e NaPA é representada na Figura 22 e na Figura 23, respectivamente.

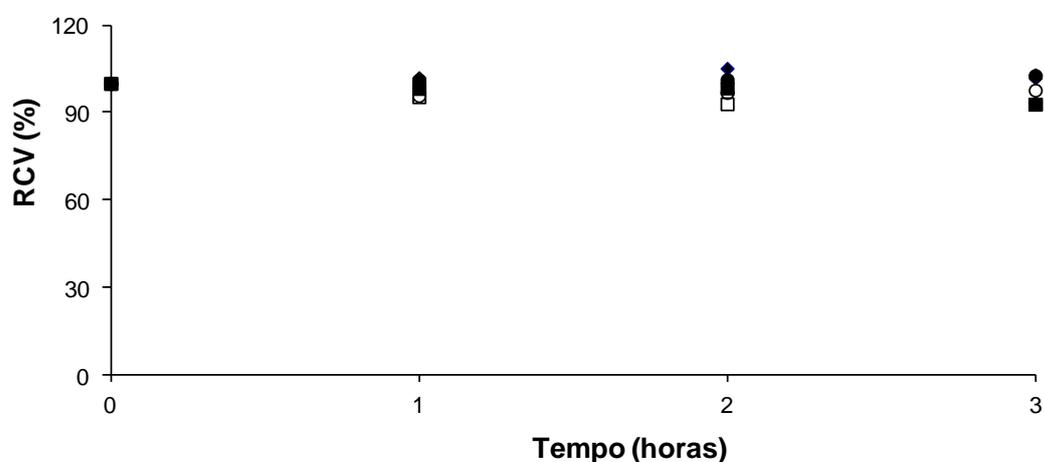


Figura 22. Estabilidade dos colorantes vermelhos na presença de diferentes tipos e concentrações de PEG (◆-PEG 1.000 5%; ◇-PEG 10.000 15%; ●-PEG 6.000 5%; ○- PEG 6.000 15%; ■-PEG 10.000 5%; □-PEG 10.000 15%; ▲-sem PEG) em função do tempo. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. Todos os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine pH 8,0/25°C.

Os resultados obtidos, para todas as condições estudadas para o PEG, mostraram que, na presença deste polímero, independentemente do tamanho e da concentração, a intensidade da cor foi mantida. Nenhuma diferença significativa é observada quando comparados os resultados obtidos com polímeros e sem os mesmos. A intensidade da perda da cor não foi maior do que 5% nas condições avaliadas. Os resultados encontrados são de grande interesse, uma vez que PEG tem sido utilizado como solubilizante e estabilizante nas indústrias farmacêutica e biomédica (VILLANOVA *et al.*, 2010). Além disso, este é um polímero aprovado para consumo pela FDA (Food and Drug Administration), devido a sua não-toxicidade e características de biodegradabilidade.

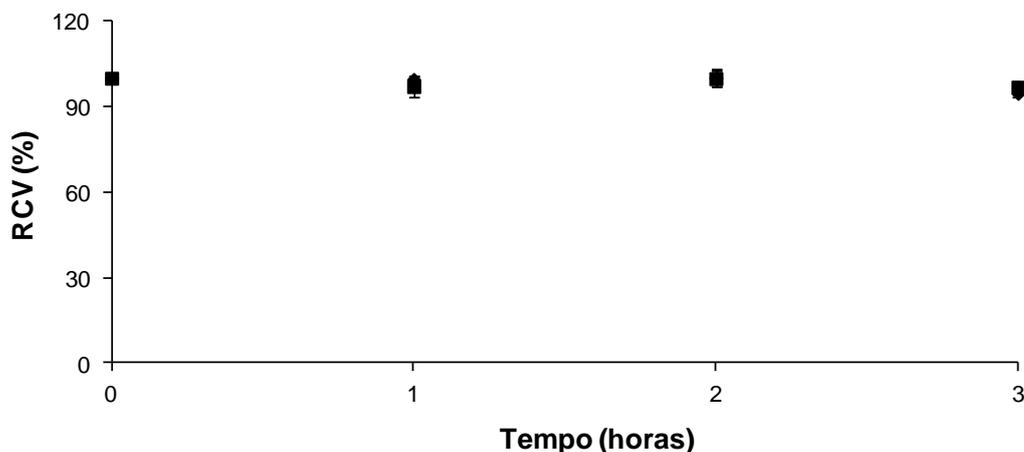


Figura 22. Estabilidade dos colorantes vermelhos na presença de diferentes concentrações de NaPA 800 g/mol (◆-5; ■-15 % p/p) em função do tempo. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. Todos os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine pH 8,0/25°C.

Na presença de NaPA, os colorantes vermelhos mostraram o mesmo comportamento obtido com o PEG. A maior perda de estabilidade foi observada com 15% deste polieletrólito (6%). Similarmente ao PEG, este resultado é de grande interesse, uma vez que o poliacrilato de sódio é um polímero inofensivo não tóxico. Outrossim, PAA (ácido poliacrílico) é o principal gelante usado na medicina e em cosméticos (VILLANOVA *et al.*, 2010).

Assim, de acordo com os resultados obtidos e descritos, tanto o PEG quanto o NaPA são polímeros inofensivos aos colorantes vermelhos. Desta maneira, não somente uma aplicação destes biocolorantes com estes polímeros, mas também a metodologia de extração baseada neles pode ser usada sem promover a degradação da cor.

4.7 Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram uma nova cepa como produtora de colorantes naturais vermelhos. Ademais, a produção destas biomoléculas em incubador rotativo foi otimizada através da ferramenta estatística. Os colorantes vermelhos produzidos mostraram estabilidade superior a condições alcalinas, não sofrendo degradação na presença de sais e polímeros. Além disso, estes colorantes foram estáveis até 70°C, enquanto temperaturas superiores promoveram a intensificação da cor. Estas observações sugeriram que estes colorantes vermelhos podem ser uma alternativa a outros colorantes naturais encontrados no mercado, que são

instáveis a uma faixa de pH e temperatura; todavia, mais investigações são requeridas para completar a caracterização destes novos colorantes.

5. CAPÍTULO V

Extraction of red colorants produced by submerged culture of *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 using aqueous two-phase polymer systems

Valéria Carvalho Santos-Ebinuma, André Moreni Lopes, Maria Francisca Simas
Teixeira, Adalberto Pessoa Jr.

Este artigo foi submetido no periódico *Separation and Purification Technology*, com fator de impacto igual a 2,92. Submissão em 25-Setembro-2012.

Extração de colorantes vermelhos produzidos por cultivo submerso de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 usando sistemas poliméricos de duas fases aquosas

5.1 Resumo

A preocupação a respeito da segurança relacionada ao aumento da aplicação de agentes colorantes sintéticos tem gerado aumento da demanda por colorantes naturais. Fungos têm sido aplicados para produzir novos e seguros colorantes. Com o objetivo de se extrair colorantes a partir do meio fermentado, adequados sistemas de extração devem ser desenvolvidos. Sistemas de duas fases aquosas (SDFA) podem oferecer favorável ambiente para os colorantes naturais. O objetivo deste trabalho foi investigar a partição de colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 em SDFA composto por poli(etileno glicol) (PEG) e poliacrilato de sódio (NaPA). Os colorantes vermelhos particionaram preferencialmente para a fase *top*, rica em PEG. O melhor coeficiente de partição dos colorantes (K_C) e a seletividade em relação a proteínas (Se_p) foram obtidos com PEG 6.000 g/mol e NaCl 0,1M, com valores de 13,06 e 3,05, respectivamente. Todavia, com PEG 10.000 g/mol e Na₂SO₄ 0,5M, resultados satisfatórios também foram obtidos ($K_C = 12,11$ and $Se_p = 2,61$). Para ambos os polímeros, o balanço de massa (BM) e a recuperação na fase *top* ($\% \eta_{TOP}$) foram próximos a 100% e 90%, respectivamente. Estes resultados indicam que a partição depende do tipo de sal e do tamanho molecular do PEG. Em conclusão, os resultados acima mostram que SDFA é um promissor método de separação para ser usado, como primeira etapa, na purificação de novos colorantes vermelhos presentes em meio fermentado.

Palavras-chave: sistemas poliméricos de duas fases aquosas; poli (etileno glicol); ácido poliacrílico; colorantes vermelhos; *Penicillium purpurogenum*.

5.2 Introdução

Atualmente, a produção de colorantes sintéticos contribui para a depreciação do suplemento global de fontes renováveis de combustíveis (DRIVAS *et al.*, 2011). Além disso, eles podem ser venenosos em diferentes extensões e apresentar ação mutagênica e carcinogênica (KONGRUANG, 2011). Diante do exposto, colorantes naturais têm sido considerados como alternativa para substituir os compostos sintéticos existentes.

Colorantes naturais podem ser obtidos a partir de plantas (BOO *et al.*, 2012; DEVEOGLU *et al.*, 2012; MARAN; MANIKANDAN, 2012), insetos (MARCO; GÄDE, 2010; UNAGUL *et al.*, 2005) e micro-organismos (HAILEI *et al.*, 2011; MEINICKE *et al.*, 2012; VELMURUGAN *et al.*, 2010b; YANG *et al.*, 2009).

A produção de colorantes por fungos pode assegurar que o metabólito de interesse será produzido sob condições controladas, independentemente de fatores externos e abastecimento sazonal de matérias-primas, além de haver potencial para minimizar as variações de batelada para batelada (MAPARI *et al.*, 2010).

A diversidade de colorantes fúngicos não varia somente em relação as suas estruturas químicas, mas também pela vasta faixa de cores que eles podem produzir e como podem ser aplicados (MAPARI *et al.*, 2009). *Penicillium purpurogenum*, que não produz micotoxinas quando cultivado em laboratório (MAPARI *et al.*, 2009), tem sido reportado como um novo produtor de colorantes azafilonas, como os produzidos por *Monascus* sp. em meio líquido (MAPARI *et al.*, 2010).

Além da etapa de produção, pesquisas envolvendo as etapas de extração de novos colorantes, utilizando métodos alternativos, são de grande interesse, já que os tradicionais métodos de extração destas biomoléculas apresentam muitos inconvenientes, tais como longo tempo do processo, baixa seletividade e baixa eficiência de extração (BORGES *et al.*, 2012). Nos últimos anos, vêm-se ampliando a utilização dos métodos de extração líquido-líquido em sistemas aquosos, com a finalidade de extrair moléculas, sejam elas biologicamente ativas ou não (SANTOS *et al.*, 2011).

A extração líquido-líquido, de forma geral, consiste em um processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para outra fase líquida imiscível

em contato com a primeira. Para tanto, se propõe a adição de polímeros hidrofílicos, que formam os chamados Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA), o que leva ao estabelecimento de duas fases aquosas imiscíveis (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003).

Os SPDFA se separam em duas fases aquosas quando dois polímeros (por exemplo, PEG e dextrana) ou um polímero e um sal apropriado (por exemplo: fosfato ou citrato) são misturados e determinadas condições termodinâmicas sejam estabelecidas. A alta concentração de água (entre 70 e 90%) em tais sistemas favorece a estabilidade de moléculas biologicamente ativas durante a separação, quando comparado a sistemas de duas fases formados com solventes orgânicos (HATTI-KAUL, 2000; JOHANSSON, 1998).

O Sistema Polimérico Polietileno glicol-Poliacrilato de Sódio (PEG/NaPA) apresenta-se como novo e barato sistema de duas fases aquosas. O sistema PEG/NaPA forma duas fases somente em determinadas condições, como a necessidade das moléculas de NaPA estarem totalmente dissociadas ($\text{pH} > 7$) (JOHANSSON *et al.*, 2008a). Além disso, é necessária a quantidade suficiente de sal no sistema, de forma a facilitar a compartimentalização do polieletrólito altamente carregado (NaPA) em uma das fases. De maneira geral, este sistema apresenta algumas vantagens: baixa viscosidade; fases claras bem definidas e possibilidade de reciclagem.

A cadeia principal do NaPA é hidrofóbica (JOHANSSON *et al.*, 2008b) e sua solubilidade é caracterizada pela presença de grupos carboxílicos (ânions) nos grupos poliméricos laterais. Estes grupos, quando carregados ($\text{pH} > 5,0$), são fortemente hidrofílicos e, por isso, PEG e NaPA separam-se em duas fases diferentes (JOHANSSON *et al.*, 2008b).

Diversas variáveis podem influenciar a formação e a partição de um soluto nos SPDFA (em termos numéricos, é quantificado pelo coeficiente de partição, K). As variáveis incluem características dos polímeros que formam as fases (tipo, massa molecular e concentração), características dos aditivos (tipo e concentração), pH , temperatura, características do soluto, entre outros (ZASLAVSKY, 1995). A aplicação biotecnológica dos SPDFA é influenciada pela habilidade de desenvolver modelos e correlações que permitam compreender como ocorre a interação entre as propriedades físico-químicas das biomoléculas e das fases dos polímeros e/ou dos sais na partição nestes sistemas (OLIVERA-NAPPA *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, o interesse por SPDFA tem aumentado devido a sua aplicação na separação e na purificação de proteínas e enzimas, tais como: ascorbato oxidase (PORTO *et al.*, 2008), ricina B (ZHANG *et al.*, 2005), bromelina (25), fosfolipase D (TEOTIA; GUPTA, 2004); betalaína (CHETHANA *et al.*, 2007), luteína (CISNEROS *et al.*, 2004), policetídeos (ESMANHOTO; KILIKIAN, 2004), ácido clavulânico (PEREIRA *et al.*, 2012) e toxina alfa de *Clostridium perfringens* tipo A (CAVALCANTI *et al.*, 2008), entre outras biomoléculas.

Neste contexto, métodos mais adequados de extração de colorantes a partir de fungos merecem ser estudados. Desta maneira, este trabalho visa estudar a extração de novos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* DPUA 1275 por extração líquido-líquido usando Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA).

5.3 Materiais e métodos

5.3.1 Reagentes

Os polímeros Polietileno glicol, de massa molar 1.000 e 6.000 g/mol, foram adquiridos da Merck®. Polietileno glicol de massa molar 10.000 g/mol, Poliácido de Sódio de massa molar 8.000 g/mol a 45% p/v e o kit ensaio de proteína BCA foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

As soluções pH 8,0 foram preparadas em tampão McIlvaine, composto de fosfato de sódio dibásico e ácido cítrico. Foi utilizada água deionizada por sistema de purificação de água Millipore®.

5.3.2 Manutenção do micro-organismo

A cepa de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 foi cedida pela Coleção de Culturas DPUA, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, AM, Brasil. A cultura estoque foi mantida em tubos inclinados contendo meio de cultura Agar Extrato de Levedura Czapek (CYA). Tubos e placas foram inoculados a 30 °C, por sete dias, e, subsequentemente, estocados a 4 °C.

5.3.3 Meio de cultura e preparo do inóculo

O meio CYA foi usado como o meio de crescimento. Este meio tem a seguinte composição (g/L água deionizada): K_2HPO_4 (1,0), extrato de levedura (5,0), sacarose (30,0), Ágar (15,0) e 10 ml/L de Czapeck concentrado [$NaNO_3$ (30,0 g), KCl (5,0 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5,0 g), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g), água deionizada q.s.p. 100 mL] (PITT, 1985). A composição do meio de produção foi similar à utilizada no inóculo, exceto pela concentração de sacarose e de extrato de levedura, que foram 48,50 e 11,80, respectivamente.

Para os experimentos de produção, frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL do requerido meio foram inoculados com 5 discos de micélio (8 mm de diâmetro), retirados da margem da colônia com auxílio de tubos de ferro com este diâmetro e cultivados em placa de Petri, por sete dias, a 30°C. O pH inicial foi de 4,5. No fim do cultivo submerso (336 horas), o meio fermentado foi filtrado e o sobrenadante foi congelado em freezer a -70 C, para ser usado nos estudos de partição. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 4,5 com HCl e autoclavados a 121 C por 15 minutos.

5.3.4 Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA)

5.3.4.1 Curvas binodais

Antes de se iniciar o estudo de partição dos colorantes vermelhos, as curvas binodais para os sistemas a serem estudados foram obtidas, de acordo com metodologia descrita por Johansson *et al.* (2011). Para cada curva binodal, 3 soluções estoques de PEG (30% p/v), NaPA (45% p/v) e sais (NaCl e Na_2SO_4 , ambos a 0,1 e 0,5 M) foram preparadas. As soluções estoques foram misturadas em tubos de vidros graduados (15 mL) com concentração conhecida de cada um dos componentes e centrifugados com o auxílio de centrífuga de bancada (719 g, 1 minuto). Em seguida, os tubos foram analisados visualmente em relação à formação das fases. Por titulação com três soluções estoques é possível obter a curva binodal. Geralmente, as soluções tornam-se turvas quando estão em um dos lados da curva binodal. Porém, próximo à curva binodal, a falta de turbidez após a mistura não é um bom indicativo de um sistema de uma fase. Assim, há a necessidade da centrifugação dos sistemas.

5.3.4.2 Partição

Os SPDFA foram preparados em tubos de vidro graduados de 15 ml, pela adição de Poliacrilato de Sódio (NaPA), Polietileno Glicol (PEG), solução salina (Na_2SO_4 ou NaCl), tampão McIlvaine (pH 8,0) e do meio fermentado com uma absorbância para os colorantes vermelhos de 2,00 $\text{UA}_{490\text{nm}}$, resultando em um sistema de massa total de 10 g. Adicionaram-se os componentes do sistema por pesagem e estes, posteriormente, foram homogeneizados em agitador orbital (Barnstead/Thermolyne, modelo 400110) a 8 rpm por 20 minutos, à temperatura ambiente.

Em seguida, o sistema foi transferido para um banho termorregulado, com valor previamente ajustado a 25°C , e mantido em repouso por 20 minutos, para separação de fases e equilíbrio das mesmas. Após o repouso, as amostras das fases superiores e inferiores foram coletadas cuidadosamente com o auxílio de pipeta de Pasteur. Cada experimento de partição foi realizado em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados.

Inicialmente, foram realizados experimentos para os PEG 1.000, 6.000 e 10.000 g/mol, para o NaPA e os sais NaCl e Na_2SO_4 , ambos nas concentrações de 0,1 e 0,5 M, com condições selecionadas de acordo com a curva binodal respectiva de cada polímero. A Tabela 14 apresenta as condições experimentais avaliadas.

Tabela 14. Condições experimentais para a partição dos colorantes vermelhos para os PEG com diferentes massas molares no SPDFA

Experimento	PEG 1.000 g/mol		PEG 6.000 g/mol		PEG 10.000 g/mol	
	%PEG	%NaPA	%PEG	%NaPA	%PEG	%NaPA
1	22	4	16	6	12	6
2	20	6	14	8	10	8
3	16	8	12	10	8	10
4	14	10	10	12	6	12
5	10	12	8	14	4	14

Os segundos experimentos foram realizados com PEG 1.000, 6.000 e 10.000 g/mol e NaPA 8.000 g/mol, a 12% cada um dos polímeros. Estes experimentos foram realizados com NaCl e Na_2SO_4 , ambos a 0,1 M e 0,5 M.

5.3.5 Métodos analíticos

5.3.5.1 Análise da produção de colorantes vermelhos

Os colorantes vermelhos foram estimados por análise espectrofotométrica, pela leitura da absorbância a 490 nm, que corresponde à máxima absorbância para os colorantes vermelhos (JOHNS; STUART, 1991). Para determinar o comprimento de onda de absorbância máxima dos colorantes vermelhos, o meio fermentado foi varrido na faixa de 220 a 600nm, em cubeta de 1 cm, à temperatura ambiente. Então, a absorbância dos colorantes vermelhos foi fixada a 490 nm.

5.3.5.2 Determinação da concentração de proteína total

A concentração de proteínas totais foi determinada através do método BCA (*Bicinchonic Acid*), de acordo com a metodologia descrita no kit BCA obtido da Sigma™. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 562 nm (SpectraMax Plus 384).

5.3.6 Análise da extração

Os resultados de partição foram analisados em termos de coeficiente de partição (K), recuperação na fase *top* (η), balanço de massa (BM) e seletividade em termos de proteínas (Se_P). As equações a seguir demonstram como cada um destes parâmetros foi calculado.

$$K = \frac{Abs_{TOP}}{Abs_{BOTTOM}} \quad \text{equação 14}$$

$$BM = \frac{Abs_{TOP} \times V_{TOP} + Abs_{BOTTOM} \times V_{TOP}}{Abs_{INICIAL} \times V_{INICIAL}} \times 100 \quad \text{equação 15}$$

$$\eta_{TOP} = \frac{Abs_{TOP} \times V_{TOP}}{Abs_{INICIAL} \times V_{INICIAL}} \times 100 \quad \text{equação 16}$$

$$Se_P = \frac{K}{K_P} = \frac{\frac{Abs_{TOP}}{Abs_{BOTTOM}}}{\frac{Proteína_{TOP}}{Proteína_{BOTTOM}}} \quad \text{equação 17}$$

em que: Abs_{TOP} , Abs_{BOTTOM} e $Abs_{INICIAL}$ representam a absorvância a 490 nm (UA_{490nm}) nas fases *top* (PEG), *bottom* (NaPA) e inicial, respectivamente. V_{TOP} , V_{BOTTOM} e $V_{INICIAL}$ representam o volume nas fases *top*, *bottom* e inicial. K_P é o coeficiente de partição das proteínas, o qual foi calculado pela razão entre a concentração de proteínas na fase *top* pela concentração das proteínas na fase *bottom*.

A razão volumétrica (R) foi calculada conforme a equação 18.

$$R = \frac{V_{PEG}}{V_{NaPA}} \quad \text{equação 18}$$

em que: V_{PEG} e V_{NaPA} representam o volume na fase PEG (*top*) e NaPA (*bottom*), respectivamente.

5.3.7 Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de $\alpha = 0,05$, resultando, portanto, no intervalo de confiança de 95%.

5.4 Resultados e discussão

5.4.1 Curvas binodais para SDFa PEG/NaPA

Para a utilização de SPDFa, é necessário o conhecimento do comportamento das fases no sistema. Além disso, é importante, ao se iniciar um trabalho com um novo sistema, construir um diagrama adequado às condições a serem utilizadas na extração, como temperatura, pH e massa molecular dos polímeros (CAVALCANTI *et al.*, 2008; PESSOA JUNIOR, KILIKIAN, 2005). Dessa maneira, as curvas binodais dos sistemas formados pelos polímeros polietileno glicol (PEG) e poliacrilato de sódio (NaPA), em tampão McIlvaine pH 8,0, na presença dos sais NaCl e Na_2SO_4 , em diferentes concentrações (0,1 e 0,5 M), foram determinadas e estão apresentadas na Figura 24. A adição de sais aos sistemas foi realizada devido ao sistema PEG/NaPA somente formar duas fases na presença de certas condições, já

que há necessidade de quantidade suficiente de sal no sistema, de forma a facilitar a compartimentalização do NaPA, um polieletrólito altamente carregado, em uma das fases (JOHANSSON *et al.*, 2008a).

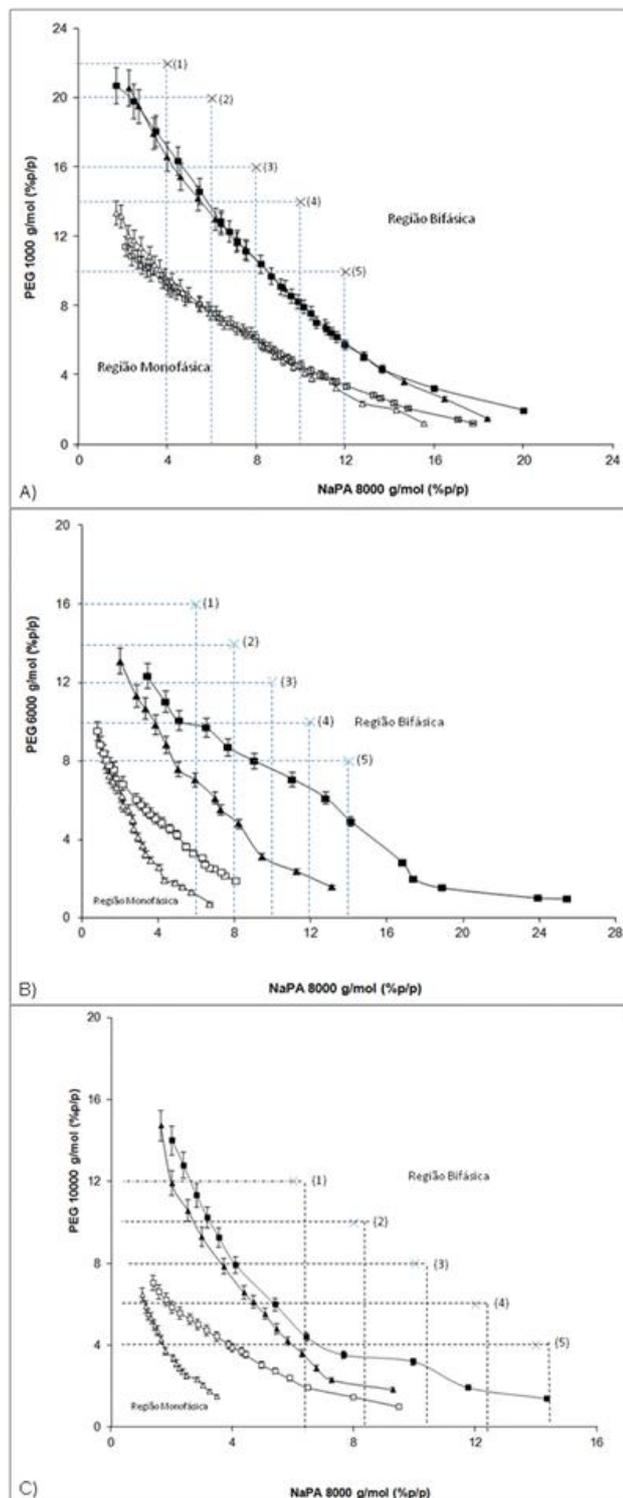


Figura 23. Curva Binodal para os sistemas formados por NaPA 8.000 g/mol/PEG 1.000 (A), 6.000 (B) e 10.000 (C) g/mol na presença de NaCl 0,1 (■), NaCl 0,5 (□), Na₂SO₄ 0,1 (▲) e Na₂SO₄ 0,5 M. Os pontos experimentais usados nas partições estão representados por x e o respectivo número da condição experimental. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A partir da Figura 23, pode-se observar que o aumento na concentração de ambos os sais avaliados, de 0,1 para 0,5 M, provocou o deslocamento da curva binodal para a região rica em água, acarretando no aumento da região de duas fases. A curva binodal pode sofrer este deslocamento até uma saturação pelo efeito do sal. O sal diminui a força de entropia da compartimentalização dos polieletrólitos. Quanto mais íons de sais são adicionados ao sistema, mais forte é o efeito. Um efeito de saturação em termos de diminuição da região de uma fase pode ocorrer quando a concentração de sal é alta o bastante para que o polieletrólito efetivamente se comporte como um polímero sem carga.

Para o PEG 1.000 g/mol, não houve diferença significativa entre os sais, ao se trabalhar com concentrações iguais de NaCl e de Na₂SO₄. Nesta condição, as curvas binodais para uma mesma concentração dos sais ficaram sobrepostas. Em contraste a este resultado, nas curvas binodais obtidas para o PEG 6.000 e o 10.000 g/mol (Figuras 24B e 24C, respectivamente), pode-se observar diferentes resultados entre o NaCl e o Na₂SO₄, que tem até mesmo efeito superior de partição entre as fases, possivelmente devido à relativa maior força de hidrofiliçidade dos íons SO₄²⁻, quando comparado ao íon Cl⁻ (JOHANSSON *et al.*, 2008b).

Assim, tanto para o PEG 6.000 g/mol quanto para o PEG 10.000 g/mol, o sal que apresentou a maior ação no sistema, deslocando a curva binodal para maior região de duas fases aquosas, foi o Na₂SO₄ a 0,5 M. Em relação às curvas binodais, para o PEG 6.000 g/mol em concentrações inferiores a 2% de NaPA 8.000 g/mol e 0,5 M, tanto de NaCl quanto de Na₂SO₄, não houve diferença significativa entre as curvas obtidas, já que estas ficaram sobrepostas. Enquanto que para o PEG 10.000 g/mol não houve sobreposição das curvas em nenhuma concentração de PEG, NaPA e sal. Entre as curvas obtidas para o PEG 6.000 e para o PEG 10.000 g/mol, o último apresentou maior região de duas fases em todas as condições estudadas.

Como observado para os sistemas com PEG 1.000 g/mol, o incremento da concentração salina de 0,1 para 0,5 M deslocou as curvas binodais para aumento da região bifásica. Considerando os tipos de sais estudados, o Na₂SO₄ teve influência superior ao NaCl, no sentido de diminuir a região monofásica nas curvas binodais.

De maneira geral, para todas as massas molares de PEG estudadas, o aumento da concentração de ambos os sais estudados deslocou a curva binodal, causando diferença nas curvas em concentrações diferentes de um mesmo sal. De acordo com a literatura, o efeito da adição de sais em SDFa varia conforme o sal e conforme o próprio sistema. Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas diferenças nos coeficientes de partição de diferentes sais, o que significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando diferença de potencial elétrico entre as fases (SARUBBO, 2000).

Johansson *et al.* (2008a) estudaram o efeito da concentração de sais em sistemas PEG/NaPA. Os autores verificaram diminuição da entropia devido à adição de sal ao sistema, sendo esse efeito superior quanto maior a força salina dos sais em solução. De acordo com os autores, esse efeito deve-se ao alto ganho de entropia do sistema, visto que numerosos contra íons do polieletrólito se distribuem por todo o sistema. Os autores também relataram que o aumento na concentração do sal e do peso molecular do polímero permitiu, em todas as condições estudadas, o aumento da região de duas fases para os polieletrólitos contidos no sistema. Ânions divalentes hidrofóbicos causaram aumento na região de duas fases aquosas da fase rica em PEG, superior ao obtido para o Na_2SO_4 , um ânion hidrofílico.

Assim, a partir dos resultados reportados acima, foram selecionadas concentrações de cada um dos polímeros para a realização dos experimentos do estudo de extração dos colorantes vermelhos do meio fermentado de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275, com o objetivo de se definir a melhor condição de extração destas biomoléculas no sistema polimérico de duas fases aquosas PEG/NaPA.

5.4.2 Estudos de partição

Os estudos de partição serão apresentados separadamente, de acordo com o tamanho molecular do PEG (1.000, 6.000 e 10.000 g/mol). O objetivo da escolha de diversos pontos, de acordo com a curva binodal, foi estabelecer os melhores parâmetros de separação. Diferentes razões volumétricas foram estudadas em cada sistema, definindo pontos acima da curva binodal em cada condição a partir das curvas binodais determinadas experimentalmente.

5.4.2.1 Estudos de partição para sistema PEG 1.000/NaPA 8.000/diferentes sais

A Tabela 15 apresenta o balanço de massa (BM), a razão volumétrica (R) e o rendimento na fase PEG (η_{TOP}), enquanto que a Figura 24 mostra o coeficiente de partição (K).

Tabela 15. Balanço de Massa (BM, %), rendimento na fase PEG (η_{TOP} , %) e razão volumétrica (R) para a partição dos colorantes vermelhos em sistema polimérico contendo PEG 1.000 e NaPA 8.000 g/mol em diferentes concentrações de ambos os polímeros e na presença de diferentes tipos e concentrações de sais.

Experimento	Sais (em M)	η_{TOP} (%)	BM (%)	R
1 (22% PEG, 4% NaPA)	NaCl 0,1	83 ± 6	84 ± 7	21,77±1,00
	NaCl 0,5	70 ± 4	85 ± 4	12,78±0,96
	Na ₂ SO ₄ 0,1	70 ± 4	85 ± 3	12,72±2,12
	Na ₂ SO ₄ 0,5	90 ± 5	97 ± 1	8,75±0,62
2 (20% PEG, 6% NaPA)	NaCl 0,1	82 ± 6	89 ± 4	7,56±1,05
	NaCl 0,5	70 ± 5	84 ± 2	4,77±0,58
	Na ₂ SO ₄ 0,1	68 ± 4	87 ± 1	4,62±0,50
	Na ₂ SO ₄ 0,5	84 ± 5	94 ± 2	4,13±0,63
3 (16% PEG, 8% NaPA)	NaCl 0,1	86 ± 5	88 ± 4	4,49±1,28
	NaCl 0,5	64 ± 6	81 ± 6	2,56±0,26
	Na ₂ SO ₄ 0,1	67 ± 2	81 ± 2	2,72±0,32
	Na ₂ SO ₄ 0,5	60 ± 3	86 ± 4	2,12±0,82
4 (14% PEG, 10% NaPA)	NaCl 0,1	70 ± 1	83 ± 1	2,48±0,51
	NaCl 0,5	66 ± 5	82 ± 1	1,53±0,75
	Na ₂ SO ₄ 0,1	67 ± 3	85 ± 3	1,56±0,13
	Na ₂ SO ₄ 0,5	65 ± 3	82 ± 5	1,75±0,00
5 (10% PEG, 12% NaPA)	NaCl 0,1	65 ± 5	81 ± 7	1,47±0,14
	NaCl 0,5	63 ± 2	89 ± 3	1,03±0,14
	Na ₂ SO ₄ 0,1	61 ± 3	83 ± 4	1,21±0,16
	Na ₂ SO ₄ 0,5	60 ± 2	82 ± 1	1,33±0,36

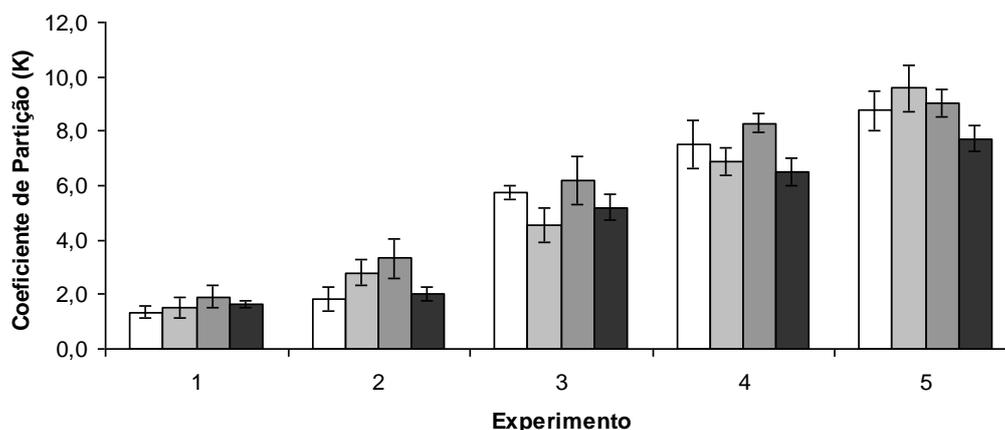


Figura 24. Coeficiente de partição do sistema PEG1.000/NaPA8.000 g/mol em tampão Mcllvaine pH 8,0 na presença de diferentes tipos e concentrações de sais: NaCl 0,1 M (barras brancas), NaCl 0,5 M (barras cinza claro), Na₂SO₄ 0,1 M (barras cinza escuro), Na₂SO₄ 0,5 M (barras pretas). As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C.

Os resultados de balanço de massa (BM) e de rendimento na fase PEG (η_{TOP}) foram superiores a 80 e 60%, respectivamente, em todas as condições. Este resultado demonstra a boa estabilidade da biomolécula frente ao sistema. Estes resultados eram esperados, já que, nos estudos de estabilidade dos colorantes vermelhos frente a diferentes concentrações destes polímeros, foram obtidos valores superiores a 90%.

De forma geral, os valores obtidos de K foram superiores a 1 (Figura 24), demonstrando que a biomolécula alvo particiona preferencialmente para a fase PEG. Além disso, pode-se observar que o incremento da concentração do NaPA e a queda na concentração do PEG proporcionaram os maiores coeficientes de partição (K).

Para o NaCl 0,1 M, no experimento 1 (22% PEG e 4% NaPA), o valor de K foi de 1,52, enquanto que, no experimento 5 (10% PEG e 12% NaPA), este valor foi, aproximadamente, 6,3 vezes superior (9,58). Estes resultados indicam que o NaPA pode ter influência superior ao PEG na partição da biomolécula. Como citado anteriormente, o NaPA é um polímero de forte carga negativa que se apresenta dissociado a valores de pH superiores a 7,0. Como os experimentos foram realizados a pH 8,0, este polímero se apresenta dissociado nas condições estudadas. Além disso, o NaPA é polímero de cadeia hidrofóbica. O aumento na concentração deste polieletrólito pode levar à maior repulsão das moléculas de colorantes da fase NaPA para a fase PEG.

Observa-se, também, que os resultados obtidos podem estar relacionados com a razão volumétrica (R) obtida em cada uma das condições estudadas. Ao se analisar os resultados da Tabela 15, em conjunto com a Figura 24, pode-se observar que os maiores valores de K foram obtidos nas menores razões volumétricas, o que significa que, em condições nas quais os volumes das fases são mais próximos, melhores resultados para estes parâmetros podem ser obtidos. À medida que houve incremento da concentração de NaPA e diminuição da concentração de PEG, a razão volumétrica nos sistemas caiu drasticamente, variando de 12,78, na primeira condição, a 1,03, na última condição avaliada. Além disso, houve influência do tipo de sal em relação aos valores de R obtidos. Como pode ser observado na Figura 24, as curvas binodais para uma mesma concentração de sal, independentemente do tipo de sal, ficaram sobrepostas. Desta maneira, era esperado que os valores de R fossem similares em condições de mesma concentração salina. Este fato provavelmente não ocorreu devido à ação de proteínas, ou de outros metabólitos gerados durante o cultivo submerso de *P. purpurogenum*, os quais podem ter interagido de maneira diferenciada com cada um dos sais, acarretando em diferentes razões volumétricas. Todavia, observou-se a tendência de que, ao se trabalhar com NaCl 0,1 M, os maiores valores para este parâmetro foram obtidos.

A influência do tipo e da concentração do sal foi menor do que a esperada. Já que, se considerarmos um dos experimentos realizados com as concentrações dos polímeros iguais e os diferentes sais, tanto os resultados do coeficiente de partição quanto dos demais parâmetros de extração são similares. Apesar disto, deve haver sal no sistema, porque é necessária quantidade suficiente deste, de forma a facilitar a compartimentalização do NaPA em uma das fases (JOHANSSON *et al.*, 2008a). Desta maneira, para o sistema PEG1.000/NaPA8.000 com diferentes sais, o maior valor de K foi de 9,58 quando se utilizou 10 e 12% de PEG e NaPA, respectivamente, com o NaCl 0,5 M.

5.4.2.2 Estudos de partição para Sistema PEG6.000/NaPA8.000/diferentes sais

A Tabela 16 apresenta o balanço de massa (BM), a razão volumétrica (R) e o rendimento na fase PEG (η_{TOP}), enquanto que a Figura 25 mostra o coeficiente partição (K).

Tabela 16. Balanço de massa (BM, %), rendimento na fase PEG (η_{TOP} , %) e razão volumétrica (R) para a partição dos colorantes vermelhos em sistema polimérico PEG 6.000/NaPA 8.000 g/mol em diferentes concentrações de ambos os polímeros e na presença de diferentes tipos e concentrações de sais.

Experimento	Sais (em M)	η_{TOP} (%)	BM (%)	R
1 (16% PEG, 6% NaPA)	NaCl 0,1	78 ± 3	84 ± 3	2,21±0,00
	NaCl 0,5	78 ± 4	87 ± 1	2,27±0,73
	Na ₂ SO ₄ 0,1	65 ± 3	90 ± 4	2,31±0,19
	Na ₂ SO ₄ 0,5	79 ± 3	87 ± 6	2,14±0,13
2 (14% PEG, 8% NaPA)	NaCl 0,1	75 ± 2	82 ± 2	1,60±0,12
	NaCl 0,5	72 ± 4	83 ± 1	1,44±0,59
	Na ₂ SO ₄ 0,1	80 ± 3	88 ± 3	1,93±0,18
	Na ₂ SO ₄ 0,5	75 ± 7	85 ± 3	1,40±0,15
3 (12% PEG, 10% NaPA)	NaCl 0,1	79 ± 3	87 ± 3	1,05±0,12
	NaCl 0,5	71 ± 5	81 ± 2	0,99±0,16
	Na ₂ SO ₄ 0,1	74 ± 2	86 ± 1	0,92±0,30
	Na ₂ SO ₄ 0,5	80 ± 2	94 ± 3	0,96±0,00
4 (10% PEG, 12% NaPA)	NaCl 0,1	78 ± 2	98 ± 3	0,82±0,10
	NaCl 0,5	77 ± 3	90 ± 3	0,75±0,06
	Na ₂ SO ₄ 0,1	68 ± 3	81 ± 1	0,74±0,21
	Na ₂ SO ₄ 0,5	77 ± 4	92 ± 2	0,70±0,18
5 (8% PEG, 14% NaPA)	NaCl 0,1	72 ± 1	83 ± 2	0,58±0,05
	NaCl 0,5	71 ± 1	82 ± 2	0,60±0,01
	Na ₂ SO ₄ 0,1	63 ± 2	82 ± 2	0,52±0,12
	Na ₂ SO ₄ 0,5	78 ± 5	93 ± 8	0,54±0,12

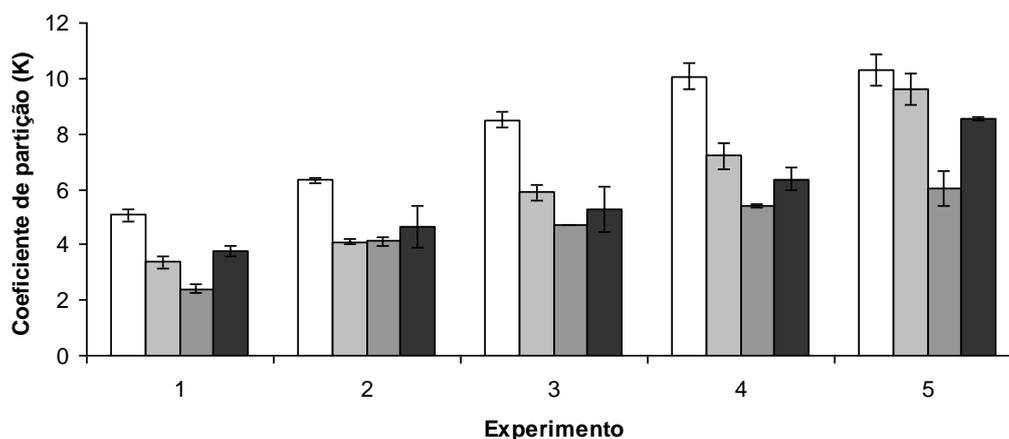


Figura 25. Coeficiente de partição do sistema PEG 6.000/NaPA 8.000 g/mol em tampão Mcllvaine pH 8,0 na presença de diferentes tipos e concentrações de sais: NaCl 0,1 M (barras brancas), NaCl 0,5 M (barras cinza claro), Na₂SO₄ 0,1 M (barras cinza escuro), Na₂SO₄ 0,5 M (barras pretas). Todos os experimentos foram realizados a 25 °C. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Tanto os valores obtidos de rendimento na fase *top* (η_{TOP}) quanto os de balanço de massa (BM) foram similares nas condições avaliadas. Para η_{TOP} , o menor valor foi obtido no experimento 5, com o Na₂SO₄ 0,1 M [63,31%; BM = 82,09% e razão volumétrica (R) de 0,52]. Para BM, o menor valor obtido (71,06%) ocorreu para o mesmo sal utilizado no experimento 5. Para ambos os parâmetros, os maiores valores foram obtidos no experimento 4, porém, com NaCl 0,1 M; η_{TOP} = 88,50% e BM = 98,08%. Nesta condição, o valor de R foi de 0,82, indicando que houve concentração da biomolécula alvo na fase *top* do sistema. De forma geral, o Na₂SO₄ 0,1 M levou aos menores resultados dos parâmetros de extração.

O sistema PEG/NaPA apresenta partição eletroneutra e, com o uso do Na₂SO₄, duas moléculas dos colorantes podem entrar na fase PEG ao mesmo tempo em que o íon sulfato (carga -2) sai dessa mesma fase. Esta mudança é um processo termodinamicamente favorável pelo fato do sal ter maior repulsão pelo PEG do que a biomolécula alvo (JOHANSSON *et al.*, 2008a). Porém, ao se trabalhar com o Na₂SO₄, resultados de coeficiente de partição inferiores podem ter sido obtidos, porque o contra-íon SO₄²⁻ é conhecido por ter forte efeito sobre o *salting-out* do PEG.

É conhecido que a solubilização do PEG em água é atribuída à ligação das moléculas de água a muitas ou todas as moléculas em torno da cadeia de polietileno (JOHANSSON *et al.*, 2008a). Essa ligação ocorre por ligações de

hidrogênio, que são relativamente fracas. O efeito de *salting-out* ocorre quando as moléculas de água são direcionadas preferencialmente para a solvatação dos íons provenientes do sal do que para as moléculas do polímero (JOHANSSON *et al.*, 2008a).

Como a principal variável a ser analisada neste trabalho é o coeficiente de partição, a Figura 25 apresenta detalhadamente os valores obtidos para este parâmetro K, bem como o erro associado.

Para o PEG 6.000 g/mol, a influência do sal foi superior à obtida com o PEG 1.000 g/mol. Para o NaCl, os valores de K obtidos para a concentração de 0,1 M foi superior a dos demais sais. Um incremento da concentração do NaCl de 0,1 para 0,5 M levou a valores inferiores de K. Porém, já para o Na₂SO₄, a influência do sal foi ao contrário da obtida com o NaCl.

Como obtido com o PEG 1.000 g/mol, a biomolécula alvo preferivelmente particionou para a fase PEG (K_c maior do que 1), o que pode ser entendido como uma contribuição a partir do efeito hidrofóbico na partição. Todavia, há também outros efeitos entrópicos, devido à diferença da entropia combinatorial entre as fases. Nas fases com igual quantidade de água e concentrações de polímeros, a fase com o menor tamanho molecular do polímero tem a maior entropia molar parcial para a biomolécula particionada. Uma vez que o NaPA é fortemente negativo a pH 8,0, terá forte repulsão com biomoléculas carregadas negativamente. Sendo assim, essa força associa-se à força iônica, elevando o valor do K quando há aumento da concentração de NaPA. Ademais, já na 1ª condição avaliada (16% PEG e 6% NaPA) para o NaCl 0,1M, o K obtido foi de 5,07. Ao longo da variação da concentração de PEG e NaPA, o incremento deste parâmetro foi de, aproximadamente, 2 vezes para todos os sais. Desta maneira, no experimento 5 (8% PEG e 14% NaPA), o valor de K foi de 10,30.

Segundo Silva e Loh (2006), a distribuição desigual de biomoléculas entre as duas fases do sistema é resultante de um intrincado e delicado balanço de interações entre a biomolécula e as outras espécies (polímeros, tampão, sal) presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio. Essas interações buscam promover uma entalpia favorável, que pode ser obtida de duas formas: devido à interação molecular existente entre a biomolécula e os componentes de cada fase ou devido à autoenergia das fases. O aumento da concentração de NaPA no sistema provoca aumento das forças repulsivas entre os

colorantes e o polímero e, assim, mais energia é liberada pelo sistema. Além da questão entalpia, a contribuição entrópica também está relacionada com o coeficiente de partição, explicando o porquê das partições dos colorantes vermelhos para a fase superior no sistema PEG-NaPA. Provavelmente, os colorantes vermelhos, ao migrarem para a fase superior, promovem a liberação de moléculas de água que estavam interagindo com o PEG, o que favorece a entropia do sistema, fazendo com que ocorra preferência destas biomoléculas para a fase superior do sistema estudado (JOHANSSON *et al.*, 2008a).

Avaliando a razão volumétrica, nos experimentos 4 (10%PEG e 12% NaPA) e 5 (8%PEG e 14%NaPA), seus valores foram inferiores a 1 em todas as condições avaliadas. Este resultado indica que, nestas condições, houve concentração dos colorantes vermelhos.

Com a análise dos coeficientes de partição, verificou-se aumento deste parâmetro com o aumento da concentração de NaPA e diminuição da concentração do PEG. Isso pode ter ocorrido porque maiores concentrações do polímero carregado podem ter levado à repulsão da molécula dos colorantes para a fase PEG, visto que o NaPA é um polieletrólito fortemente negativo na condição estudada e a biomolécula colorante estudada pode ser carregada negativamente. O maior valor de K, 10,29, foi obtido para a concentração de 10% de PEG e 12% de NaPA (condição 5) e NaCl 0,1 M. Nesta condição de extração, houve concentração da biomolécula na fase *top*, pois o valor de R foi de 0,58. Estes resultados mostram que a influência do poliacrilato de sódio é superior à influência do PEG em relação ao K, provavelmente devido a sua carga negativa, que causa maior repulsão da biomolécula para a fase PEG.

Tal como realizado para o PEG 1.000 g/mol, foi efetuada uma primeira varredura das concentrações de PEG e NaPA com vários pontos, de forma a se analisar qual a tendência do coeficiente de partição, na qual se verificou aumento deste parâmetro à medida que aumentava a concentração do NaPA e diminuía a concentração do PEG.

5.4.2.3 Estudos de partição para sistema PEG 10.000/NaPA 8.000/diferentes sais

A Tabela 17 apresenta o balanço de massa (%BM), a razão volumétrica (R) e o rendimento na fase PEG (η_{TOP}), enquanto a Figura 26 mostra o coeficiente partição (K).

Tabela 17. Balanço de massa (BM, %) e rendimento obtido na fase PEG (η_{TOP} , %) para a partição dos colorantes vermelhos em sistema polimérico PEG 10.000/ NaPA 8.000 g/mol em diferentes concentrações de ambos os polímeros e na presença de diferentes tipo e concentrações de sais.

Experimento	Sais (em M)	η_{TOP} (%)	BM (%)	R
1 (12% PEG, 6% NaPA)	NaCl 0,1	68 ± 3	90 ± 7	1,28±0,04
	NaCl 0,5	75 ± 4	89 ± 4	1,77±0,09
	Na ₂ SO ₄ 0,1	82 ± 5	93 ± 4	1,85±0,11
	Na ₂ SO ₄ 0,5	83 ± 2	95 ± 3	1,21±0,13
2 (10% PEG, 8% NaPA)	NaCl 0,1	71 ± 2	82 ± 8	1,18±0,60
	NaCl 0,5	68 ± 8	89 ± 4	1,05±0,24
	Na ₂ SO ₄ 0,1	75 ± 4	89 ± 6	1,09±0,12
	Na ₂ SO ₄ 0,5	84 ± 0	95 ± 2	0,93±0,08
3 (8% PEG, 10% NaPA)	NaCl 0,1	61 ± 4	78 ± 5	0,60±0,21
	NaCl 0,5	65 ± 2	87 ± 6	0,76±0,09
	Na ₂ SO ₄ 0,1	80 ± 5	92 ± 2	0,80±0,00
	Na ₂ SO ₄ 0,5	79 ± 1	93 ± 3	0,54±0,02
4 (6% PEG, 12% NaPA)	NaCl 0,1	62 ± 2	79 ± 2	0,50±0,19
	NaCl 0,5	60 ± 4	84 ± 5	0,49±0,04
	Na ₂ SO ₄ 0,1	80 ± 5	91 ± 5	0,48±0,14
	Na ₂ SO ₄ 0,5	75 ± 2	95 ± 2	0,33±0,08
5 (4% PEG, 14% NaPA)	NaCl 0,1	71 ± 5	87 ± 5	0,44±0,13
	NaCl 0,5	69 ± 6	90 ± 2	0,55±0,00
	Na ₂ SO ₄ 0,1	72 ± 4	91 ± 6	0,29±0,00
	Na ₂ SO ₄ 0,5	71 ± 1	92 ± 4	0,21±0,07

De forma geral, os maiores valores de BM foram obtidos com o Na₂SO₄ 0,5 M, variando dentre as condições analisadas entre 91,66 (condição 5) e 95,26% (condição 2). Entre os demais sais estudados, o BM variou entre 78,44 (condição 3, NaCl 0,1 M) e 92,49% (condição 1, Na₂SO₄ 0,1 M). Estes resultados demonstram a boa estabilidade da biomolécula frente ao NaPA, ao PEG 10.000 g/mol e aos sais. Em relação ao η_{TOP} , o Na₂SO₄, independentemente da concentração estudada, os valores obtidos foram superiores para o NaCl tanto a 0,1 quanto a 0,5 M. O menor valor obtido para este parâmetro foi de 59,87%, na condição 4 (6% PEG, 12% NaPA), com o

NaCl 0,5 M, e o maior foi na condição 2 (10% PEG, 8% NaPA) de 84,24% e Na_2SO_4 0,5 M.

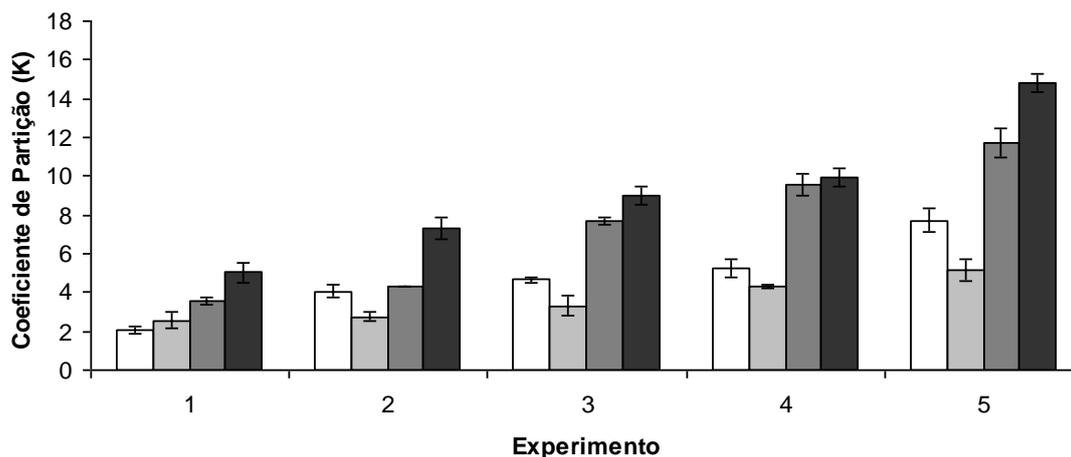


Figura 26. Coeficiente de partição do sistema PEG 10.000/NaPA 8.000 g/mol em tampão Mcllvaine pH 8,0 na presença de diferentes tipos e concentrações de sais: NaCl 0,1 M (barras brancas), NaCl 0,5 M (barras cinza claro), Na_2SO_4 0,1 M (barras cinza escuro), Na_2SO_4 0,5 M (barras pretas). As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C.

Da mesma maneira que foi obtido para as demais massas molares de PEG, o aumento da concentração do NaPA e a menor concentração de PEG acarretaram em incremento nos valores de K. O melhor resultado foi obtido na condição 5 (4% PEG, 14% NaPA), com o valor de K igual a 14,78, ao se trabalhar com Na_2SO_4 0,5 M. Em todas as condições avaliadas, o Na_2SO_4 proporcionou os melhores resultados, com destaque para a concentração de 0,5 M. Em relação à razão volumétrica entre as duas fases, a partir da condição 3, em todas as demais analisadas este parâmetro foi inferior a 1, apresentando a fase PEG mais concentrada que a fase NaPA.

Para o PEG 10.000 g/mol, os resultados apresentados na Figura 26 indicam que, ao se trabalhar no sistema com relativa alta concentração salina, além do efeito entrópico, os polímeros com altas massas molares podem sofrer *salting-out* mais facilmente do que polímeros de tamanho inferiores. É importante frisar que esta é uma suposição, já que as proporções dos polímeros não são as mesmas ao se avaliar diferentes massas molares de PEG.

Ademais, esta queda na concentração de PEG faz o ambiente ser menos favorável em termos da direção da força entrópica. Desde que a fase

PEG torna-se mais concentrada e mais hidrofóbica, poderia ser esperada maior partição para a fase PEG. Todavia, o efeito entálpico é subcompensado pela diminuição da entropia parcial molar da biomolécula (JOHANSSON *et al.*, 2008b).

O aumento na concentração do sal pode acarretar uma série de efeitos na carga do sistema PEG/NaPA. Primeiramente, a carga de NaPA é mais facilmente compartimentalizada, ou seja, há maiores diferenças na concentração de NaPA entre as fases (JOHANSSON *et al.*, 2008b). Além disso, a altas concentrações de Na_2SO_4 , a fase PEG tende a tornar-se mais concentrada, possivelmente devido ao aumento do efeito hidrofóbico causado pelo sal. Durante a partição, ocorre saída de sal da fase PEG quando os colorantes vermelhos particionam para essa mesma fase. No entanto, enquanto que, para o Na_2SO_4 , migram dois íons, para a fase NaPA, com o NaCl, entra apenas uma molécula do colorante na fase superior do sistema, ao mesmo tempo em que sai um íon cloreto, visto este ser de carga -1. Como o íon apresenta maior repulsão ao PEG do que os colorantes, esse irá para a fase NaPA, de forma a atingir equilíbrio termodinâmico. Associa-se também a esse mecanismo a força entrópica entre ambas as fases – e, como sabemos, o aumento da concentração polimérica leva ao aumento dessa força motriz e, conseqüentemente, aumento da partição dos colorantes.

Esmanhoto e Kilikian (2004) estudaram a extração dos pigmentos vermelhos, rubropunctamina e monascorubramina, produzidos a partir do cultivo submerso de *Monascus purpureus*, utilizando SdFA constituído por PEG e fosfato. Diferentes condições, como tipo de PEG, porcentagem de PEG, pH e concentração de fosfato foram estudadas. Nestes estudos, os maiores valores de coeficiente de partição ocorreram na condição com o PEG 6.000 g/mol a 20% e fosfato 15%, variando o pH de 7,0 a 9,0.

Mageste *et al.* (2009) estudaram a partição de corante natural carmim de cochonilha em sistema de duas fases aquosas preparado pela mistura de soluções aquosas de polímero (PEO 1.500) ou copolímero (L35) com soluções aquosas (Na_2SO_4 e Li_2SO_4). Os resultados obtidos sugeriram que a partição dos colorantes é altamente dependente da natureza do polieletrólito e do pH do sistema. As moléculas de carmim foram concentradas na fase rica em polímero em ambos os sistemas estudados. Além disso, os autores sugerem que a interação entálpica entre o carmim e o PEO (ou as macromoléculas do

copolímero L35) provavelmente ocorre entre o carmim e as unidades de óxido de etileno, sendo esta interação muito dependente do eletrólito. Esta dependência de sal foi atribuída à intermediação do cátion na interação carmim-macromolécula.

Em geral, o comportamento da partição de algum soluto depende da massa molar do polímero que compõe o SDFa. Comumente, se a massa molar do polímero em SDFa aumenta, a concentração do soluto diminui na fase na qual o polímero predomina. A principal causa deste típico comportamento da partição é que o aumento no tamanho macromolecular reduz a contribuição da entropia configuracional para minimizar a energia de transferência de Gibbs (MAGESTE *et al.*, 2009).

Nesta série de experimentos, o PEG 10.000 g/mol proporcionou os melhores resultados dos parâmetros de partição. O fenômeno descrito anteriormente, também denominado efeito de volume de exclusão, em suma, pode ser descrito como: “quanto maior a massa molar do PEG, menor o espaço entre as moléculas na fase superior, conseqüentemente, aquelas são expulsas para outra fase”. Porém, para os colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum*, a força que provavelmente prevalece no sistema é a de repulsão entre a biomolécula-alvo e o NaPA. Além disso, algum tipo de interação ocorre entre a biomolécula alvo e a cadeia polimérica para que esta tenha maior interação pela fase PEG e seu K seja superior ao se trabalhar com o PEG com massa molar de 10.000 g/mol.

Antes de se concluir qual o melhor sistema para partição dos colorantes naturais vermelhos do meio fermentado de *P. purpurogenum*, novos estudos comparando uma mesma concentração de ambos os polímeros com todos os sais analisados anteriormente foram realizados e os resultados são mostrados a seguir.

5.4.2.4 Estudos de partição variando o tipo de PEG/NaPA 8.000/diferentes sais

Para avaliar diretamente a influência do sal em diferentes massas molares de PEG, estudos de partição para a extração dos colorantes vermelhos produzidos por *P. purpurogenum* foram realizados, utilizando ambos os polímeros na proporção de 12% cada um. As massas molares de PEG

estudadas foram: 1.000, 6.000 e 10.000 g/mol com os sais NaCl e Na₂SO₄, em duas concentrações 0,1 e 0,5 M. Os resultados destes experimentos foram expressos em termos de coeficiente de partição (K) e seletividade em termos de proteína (Se_P). A estratégia de se estudar a seletividade em termos de proteína, nesta etapa do trabalho, foi proporcionar, através do SDFA formado por PEG e NaPA, um sistema com parcial separação das proteínas que são contaminantes presentes no meio fermentado em relação aos colorantes vermelhos. Os resultados do coeficiente de partição estão apresentados na Figura 27.

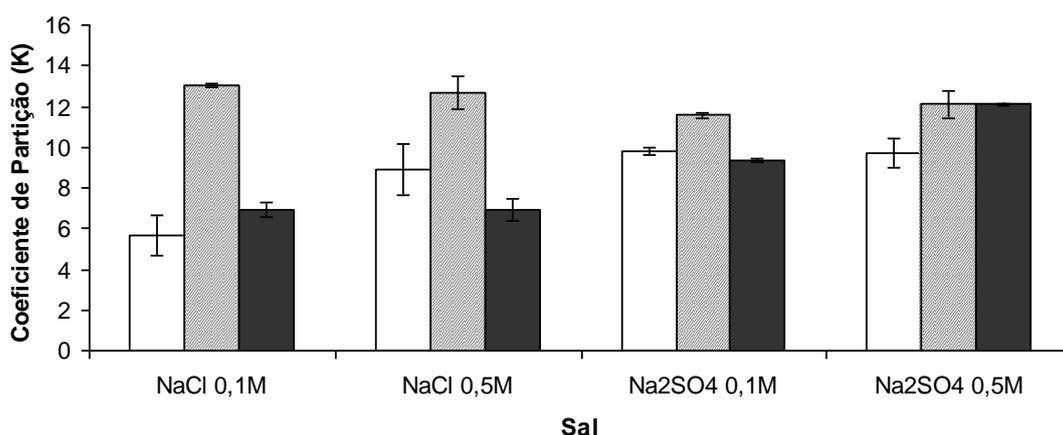


Figura 27. Coeficiente de partição do sistema formado por diferentes massas molares de PEG/NaPA 8.000 g/mol em tampão McIlvaine pH 8,0 na presença dos sais: NaCl 0,1M, NaCl 0,5M, Na₂SO₄ 0,1M, Na₂SO₄ 0,5 M. PEG 1.000 (barras brancas), 6.000 (barras mescladas) e 10.000 (barras pretas) Da. Todos os experimentos foram realizados a 25°C. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos iniciais, observou-se que os colorantes vermelhos particionam preferencialmente para a fase PEG. O PEG 1.000 g/mol proporcionou os menores K quando comparado às demais massas molares avaliadas. O PEG 6.000 g/mol proporcionou os maiores valores independentemente do sal estudado. Ao se utilizar PEG 6.000 g/mol e NaCl nas concentrações de 0,1 e 0,5 M, os valores de K obtidos foram de 13,06 e 12,67, respectivamente, que são valores iguais ao se considerar o erro experimental. Para esta massa molar de PEG, o emprego do Na₂SO₄ acarretou em K inferiores aos obtidos com NaCl. Em relação, ao NaCl 0,1 M, estes valores foram de 12,87 e 7,84% inferiores para o Na₂SO₄ a 0,1 e 0,5 M.

Para o PEG 10.000 g/mol, ao contrário do obtido com o PEG 6.000 g/mol, o NaCl resultou nos menores valores de K. Quando comparado aos valores de K obtidos para o NaCl 0,1 M com PEG 6.000 g/mol, para o PEG 10.000 g/mol e NaCl 0,1 e 0,5 M, os valores foram, aproximadamente, 45% inferiores para ambas as concentrações. Este resultado demonstra o forte efeito da interação entre o sal e a concentração do PEG na partição dos colorantes vermelhos. Para o PEG 10.000 g/mol, o Na₂SO₄ teve efeito superior ao NaCl na partição, enquanto a maior concentração deste sal promoveu maiores valores de K. Este aumento foi próximo a 75% para o NaCl, tanto a 0,1 quanto a 0,5 M. Estes resultados estão em concordância com os obtidos no estudo de diferentes concentrações de PEG e NaPA, nos quais o Na₂SO₄ gerou os maiores valores de K.

O fato de os melhores resultados de coeficiente de partição terem sido obtidos com massa molar de PEG superiores, independentemente do sal utilizado, pode ser explicado pela maior solubilidade dos colorantes vermelhos ao se trabalhar com a maior massa molecular deste polímero. A interação entre o tipo de sal e o massa molar do polímero gerou os melhores resultados com NaCl, para o PEG 6.000 g/mol, e com 0,5 M de Na₂SO₄, para o PEG 10.000 g/mol.

Tabela 18. Balanço de massa (BM, %) e rendimento obtido na fase PEG (η_{TOP} , %) para a partição dos colorantes vermelhos em sistema polimérico PEG (1.000, 6.000 e 10.000)/ NaPA 8.000 g/mol com 12% de cada um dos polímeros e na presença de diferentes tipo e concentrações de sais. Os sistemas foram preparados em tampão Mcllvaine pH 8,0, à temperatura de 25 °C.

PEG (g/mol)	Sais (em M)	η_{TOP} (%)	BM (%)	R
1.000	NaCl 0,1	87 ± 5	105 ± 1	0,85±0,07
	NaCl 0,5	93 ± 6	105 ± 6	0,87±0,01
	Na ₂ SO ₄ 0,1	86 ± 2	96 ± 1	0,84±0,07
	Na ₂ SO ₄ 0,5	85 ± 2	96 ± 2	0,84±0,03
6.000	NaCl 0,1	92 ± 3	103 ± 4	0,73±0,01
	NaCl 0,5	90 ± 3	99 ± 2	0,79±0,06
	Na ₂ SO ₄ 0,1	98 ± 0	109 ± 0	0,74±0,07
	Na ₂ SO ₄ 0,5	98 ± 2	108 ± 1	0,75±0,00
10.000	NaCl 0,1	90 ± 2	107 ± 3	0,76±0,02
	NaCl 0,5	88 ± 1	104 ± 1	0,79±0,06
	Na ₂ SO ₄ 0,1	92 ± 1	107 ± 2	0,66±0,02
	Na ₂ SO ₄ 0,5	94 ± 3	104 ± 3	0,76±0,02

Em relação a BM e η_{TOP} , os valores obtidos para estes parâmetros foram próximos a 100 e 90%, respectivamente, o que demonstra a boa estabilidade dos colorantes vermelhos, frente às condições avaliadas, e que a biomolécula-alvo é fortemente atraída para a fase PEG no sistema estudado. Em todos os experimentos, a razão volumétrica foi inferior a 1. É sabido que em um sistema, no qual ambos os polímeros têm a mesma concentração no sistema, como nestes experimentos, eles repelem-se mutuamente e, logo, uma fase superior de pequeno volume indica que o polímero da fase superior é mais concentrado do que o polímero da fase inferior. Estes resultados demonstram que, além de extrair os colorantes vermelhos para a fase PEG, o sistema também concentra estas biomoléculas.

Além de K , BM e η_{TOP} , nesta etapa do trabalho também foi determinada a seletividade em termos de proteínas, ou seja, determinou-se quanto das proteínas presentes no meio fermentado se separam dos colorantes vermelhos durante esta etapa inicial de extração. Estes resultados estão apresentados na Figura 28.

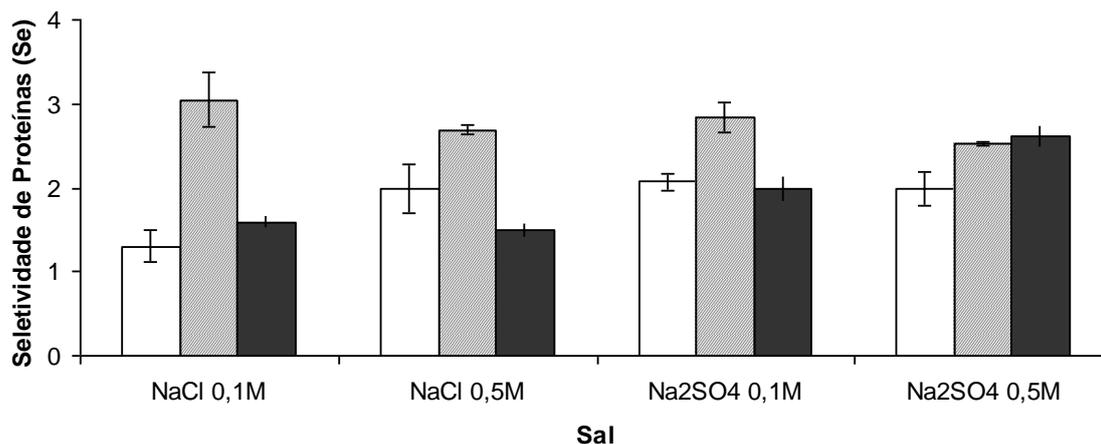


Figura 28. Seletividade de proteínas (Se) no sistema formado por diferentes massas molares de PEG e na presença de NaPA 8.000 g/mol em tampão McIlvaine pH 8,0 na presença dos sais: NaCl 0,1M, NaCl 0,5M, Na₂SO₄ 0,1M, Na₂SO₄ 0,5 M. PEG 1.000 (barras brancas), 6.000 (barras mescladas) e 10.000 (barras pretas) g/mol. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

As proteínas particionaram preferencialmente para a fase PEG, com K_{Prot} próxima a 4,00 para todas as condições. Assim, a melhor maneira de se avaliar a partição das proteínas em relação aos colorantes vermelhos é através

da seletividade. Em termos de seletividade, os colorantes vermelhos têm maior preferência pela fase PEG em relação às proteínas presentes no meio fermentado. A seletividade foi superior para o PEG 6.000 g/mol e NaCl 0,1 M (3,05). Para este mesmo sal, este valor foi 134 e 90% superior em relação ao PEG 1.000 e PEG 10.000 g/mol, respectivamente.

Para os demais sais avaliados, o PEG 6.000 g/mol também proporcionou as maiores seletividades, variando entre 2,52 e 2,84. Para as demais massas molares de PEG e sais, a seletividade ficou em torno de 2,00, com exceção do PEG 10.000 g/mol com adição de Na₂SO₄ 0,5 M, o qual gerou a seletividade de 2,61. Apesar de as proteínas migrarem preferencialmente para a fase PEG, as proteínas que são carregadas positivamente podem interagir fortemente com o NaPA e este sistema pode ser utilizado como uma primeira etapa de separação dos colorantes vermelhos de outros metabólitos presentes no meio fermentado.

Johansson *et al.* (2008a) estudaram a partição das proteínas hemoglobina, lisozima e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), utilizando o sistema PEG/NaPA na presença dos sais NaCl e Na₂SO₄. A hemoglobina, quando extraída em pH 9,0, particiona preferencialmente para a fase PEG, assim como a lisozima (carregada positivamente), enquanto que a G6PDH (carregada positivamente) particiona para a fase NaPA.

Os resultados de seletividade das proteínas associados com os de K, BM e η_{TOP} mostram que o PEG 6.000 g/mol com NaCl e o PEG 10.000 g/mol com Na₂SO₄ 0,5 M têm maior potencial para a partição dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* DPUA 1275. Desta maneira, estas massas molares de PEG serão avaliadas em diferentes condições em novos experimentos.

5.5 Conclusão

Para os estudos de extração dos colorantes vermelhos pelo Sistema Polimérico de Duas Fases Aquosas (SPDFA) com polietileno glicol (PEG) e poliácido acrílico de sódio (NaPA), os colorantes migraram preferencialmente para a fase PEG e foram obtidos coeficientes de partição maiores do que 10. Os melhores resultados foram encontrados com PEG 6.000 g/mol/NaCl e PEG 10.000 g/mol/Na₂SO₄ 0,5 M. Desta forma, este método de extração pode ser

considerado eficiente para extração dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum*.

6. CAPÍTULO VI

Separação de colorantes vermelhos produzidos por cultivo submerso de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 usando *Colloidal Gas Aphrons*

Este artigo será submetido no periódico *Separation and Purification Technology*, com fator de impacto igual a 2,92.

6.1 Resumo

Há interesse mundial no desenvolvimento de processos para produção e extração de colorantes a partir de fontes naturais. Micro-organismos são uma fonte alternativa para estas biomoléculas, podem ser produzidos por tecnologia de cultivo e extraídos do meio fermentado. O objetivo do presente trabalho foi estudar a recuperação de colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275, usando a técnica de *Colloidal Gas Aphrons* (CGA), que são microbolhas de surfactantes estabilizadas. Experimentos preliminares foram realizados para avaliar a solubilidade dos colorantes vermelhos em diferentes solventes orgânicos; partição octanol-água e sua estabilidade frente aos surfactantes: Brometo de Cetiltrimetilamônio, CTAB nos níveis de pH de 6,9 a 10,0, Dodecil Sulfato de Sódio, SDS e Polioxietileno sorbital monolaurato, Tween 20. Os resultados mostraram que os colorantes vermelhos têm características mais hidrofílicas e são estáveis frente a todos os colorantes analisados. Os experimentos iniciais, realizados usando CGA geradas pelos mesmos surfactantes listados acima a diferentes razões volumétricas (V_{RATIO} , 3-18), mostraram que CTAB e Tween 20 foram melhores do que SDS na recuperação dos colorantes vermelhos. Desta maneira, o estudo foi conduzido somente com CTAB e Tween 20. Para o CTAB, o pH 9,0 promoveu os melhores resultados a V_{RATIO} de 12, como segue: recuperação, Re , 70%, e coeficiente de partição, K , 5,39, seletividade em termos de proteínas e açúcares ($Se_{PROT} = 3,75$ e $Se_A = 7,20$, respectivamente). Estes resultados indicam que com o CTAB a recuperação é dirigida principalmente por interações eletrostáticas. Quando os colorantes vermelhos foram dispersos em Tween 20 e etanol nenhuma melhoria nos parâmetros de recuperação foi obtida. Desta maneira, os resultados na condição sem dissolução foram: $Re=56,6\%$, $K=2,44$, $Se_A=2,70$, $Se_{PROT}=1,73$. Além disso, com Tween 20 a separação é dirigida principalmente por interações hidrofóbicas. Estes resultados mostram que CTAB proporcionou maiores valores de parâmetros de recuperação. Todavia, dependendo da aplicação dos colorantes vermelhos, o uso de Tween 20 é mais favorável devido a toxicidade do CTAB. Em conclusão, os resultados mostram que CGA é uma técnica promissora e pode ser utilizada como primeira etapa de recuperação para extrair colorantes vermelhos do meio fermentado.

Palavras-chave: colorantes naturais, extração, surfactantes, *Colloidal Gas Aphrons*

6.2 Introdução

Nos últimos anos, vêm crescendo o interesse por novos métodos de extração de biomoléculas. Dentro deste contexto, processos de purificação baseados em surfactantes são técnicas de separação muito promissoras (DERMIKI *et al.*, 2009). Surfactantes são moléculas anfifílicas compostas de uma porção hidrofílica ou polar, conhecida como cabeça, e uma porção hidrofóbica ou não-polar conhecida como cauda. A cabeça do surfactante pode ser carregada positivamente (surfactante catiônico) e negativamente (surfactante aniônico), dipolar (zwitteriônico) ou não-carregada (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2005). Dodecil sulfato de sódio (SDS), Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) e Tween 20 são exemplos de surfactantes aniônico, catiônico e não iônico, respectivamente (Figura 29).

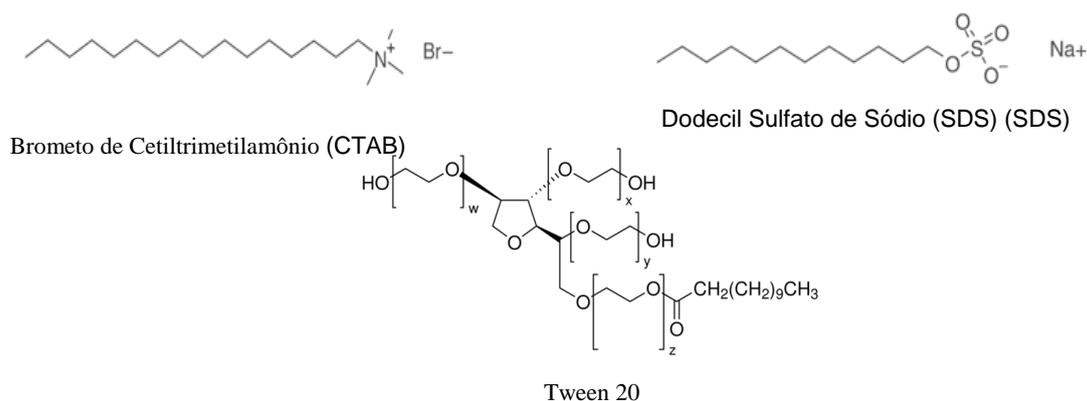


Figura 29. Estrutura química dos surfactantes Dodecil sulfato de sódio (SDS), Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) e Tween 20.

Os surfactantes têm a tendência de adsorver na superfície, se associando para formar micelas que dissolvem solutos não-polares (DERMIKI *et al.*, 2009; ROY *et al.*, 1995). Estes sistemas têm baixo requerimento de energia e podem ser usados para tratar materiais degradados (DERMIKI *et al.*, 2009; SCAMEHORN; HARWELL, 2000). Uma aplicação de surfactantes para o processo de extração é seu uso na tecnologia de *Colloidal Gas Aphrons* (CGA). As CGA são microbolhas de surfactantes estabilizadas (10-100 μm de diâmetro), formadas pela agitação de uma solução de surfactante à alta velocidade (> 8.000 rpm) (ALVES *et al.*, 2006; JAUREGI *et al.*, 2000). É postulado que CGA possui uma estrutura multicamada de surfactantes e que, comparadas com bolhas convencionais, elas têm diferentes características de dispersão. Na estrutura proposta por Sebba (1987), que está apresentada na

Figura 30, a face de fora da microbolha pode ser carregada, dependendo do surfactante usado para produzir CGA (DERMIKI *et al.*, 2009). Isto resultará que moléculas carregadas com cargas opostas ou não-carregadas adsorveram na sua separação efetiva a partir da solução líquida (DERMIKI *et al.*, 2009; SPIGNO; JAUREGI 2005), além disso, a seletividade da adsorção pode ser melhorada (DERMIKI *et al.*, 2009; FUDA *et al.*, 2005).

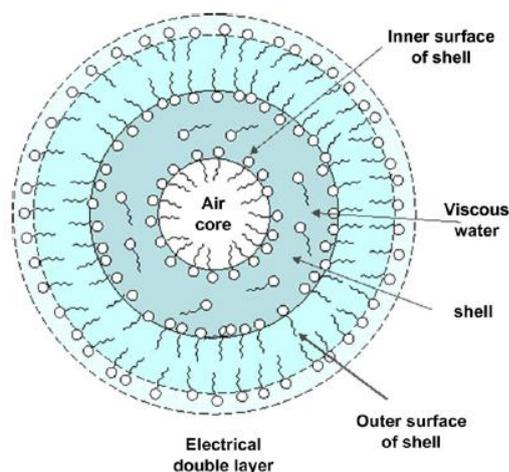


Figura 30. Estrutura proposta por Sebba (1987).

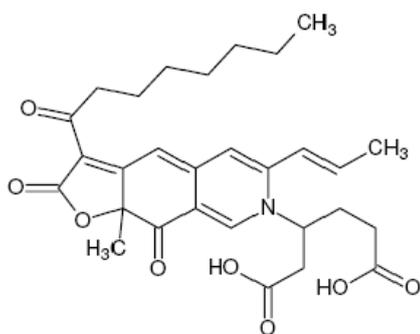
Em relação às características da CGA, ela possui propriedades como: alta área interfacial e estabilidade comparada a bolhas convencionais; além de possuir a habilidade de ser bombeada e se separar facilmente a partir da fase líquida. Desta maneira, por esta técnica, há redução do número de etapas no processo de purificação/recuperação do produto, o que acarreta em uma técnica de separação custo efetiva superior, se comparada a métodos convencionais de purificação, como centrifugação e extração de fluido supercrítica. Além disso, a presença de surfactantes pode ser benéfica em termos de formulação do produto final para consumo humano (DERMIKI *et al.*, 2009). Devido as suas propriedades, CGA tem sido aplicado em processos de separação (SEBBA, 1987) de diferentes biomoléculas, como proteínas (FUDA, ELISABETH *et al.*, 2004, 2005), polifenóis (SPIGNO *et al.*, 2010; SPIGNO; JAUREGI, 2005) e colorantes naturais (ALVES *et al.*, 2006; DERMIKI *et al.*, 2008, 2010).

Grande parte dos colorantes extraídos, não somente por CGA, mas também por outras técnicas, como extração líquido-líquido com solventes orgânicos, é de colorantes naturais oriundos de plantas. Todavia, há grande

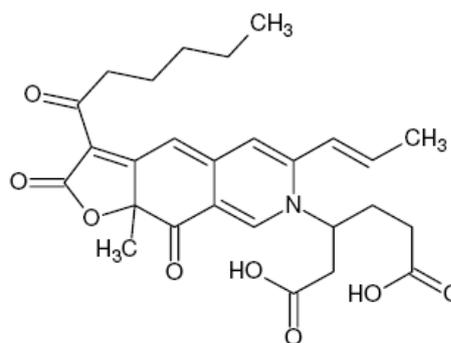
interesse por colorantes naturais oriundos de outras fontes, como os produzidos por micro-organismos. Entre estes, a produção de colorantes por fungos é uma alternativa, pois este processo pode ocorrer sobre condições controladas em biorreatores, que oferecem a manufatura dos colorantes independentemente de fatores externos, suprimento sazonal de matérias-primas e potencial variação de batelada para batelada (MAPARI *et al.*, 2010).

A diversidade de colorantes fúngicos não é somente encontrada em sua estrutura química, mas também na faixa de cores destas biomoléculas (MAPARI *et al.*, 2006; MEINICKE *et al.*, 2012). Colorantes fúngicos são produzidos como metabólitos secundários de função conhecida ou não (MAPARI *et al.*, 2010). Colorantes policetídeos de viabilidade comercial são os produzidos por *Monascus*, os quais vêm sendo usados como colorantes de alimentos por centenas de anos no Oriente. Todavia, espécies de *Monascus* têm sido reportadas como co-produtoras de micotoxina citrinina e de outros metabólitos potencialmente tóxicos (MAPARI *et al.*, 2010). Então, há grande interesse na pesquisa por alternativos organismos produtores de colorantes (HAILEI *et al.*, 2011).

O *Penicillium purpurogenum*, que não produz nenhuma micotoxina conhecida, quando crescido sob condições laboratoriais (MAPARI *et al.*, 2009), tem sido reportado como um novo produtor de colorantes azafilonas, como *Monascus* em meio líquido (MAPARI *et al.*, 2010). N-glutarylmonascorubramina e N-glutarilrubropuntacmina (Figura 31) foram os colorantes de *Monascus* solúveis em água descobertos nos colorantes extracelulares extraídos obtidos do meio líquido de *P. purpurogenum* (CHO *et al.*, 2002). A estrutura dos policetídeos é conhecida por não ter elétrons carregados negativamente. Estas moléculas, frequentemente, contêm funcionalidade poli-insaturada, ou seja, sistema de anéis, um ou mais grupos carbonila, ácido carbólico e grupo funcional éster ou amida, o que faz com que os policetídeos apresentem características no espectro UV-visível (MAPARI *et al.*, 2006).



N-glutarylmonascorubramina
(C₂₈H₃₃NO₈, 511,23)



N-glutarylrubropunctamina
(C₂₆H₂₉NO₈, 483,20)

Figura 31. Estrutura química dos colorantes vermelhos produzidos por *Monascus* FONTE: Mapari *et al.* (2009).

A partir do exposto acima, o objetivo deste estudo foi investigar a recuperação de colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *Penicillium purpurogenum* usando o CGA gerado por uma variedade de surfactantes, sob diferentes condições, a fim de oferecer não somente novos colorantes aos existentes no mercado, mas também uma técnica de separação alternativa aos métodos tradicionais de separação.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 Materiais

CTAB, SDS, Tween 20, octanol e o kit ensaio de proteína BCA foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. O agitador de alta velocidade com hélice de quatro pás (D= 30 mm), rodeado por uma cobertura perfurada e leitor de velocidade digital foi fornecido por Silverson (Waterside, Bucks, UK). Os espectrofotômetros usados foram Ultrospec 1100 adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech (Biochrom, Cambridge, UK) e PerkinElmer lambda 20 UV-vis acoplado com microcomputador. O pH foi medido com pHmetro Whatman (PHA 320, Kent, UK). O açúcar total foi medido com refratômetro.

6.3.2 Manutenção do micro-organismo e fermentação

A cepa de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 foi cedida pela Coleção de Culturas DPUA, do Departamento de Parasitologia da Universidade

Federal do Amazonas – UFAM, AM, Brasil. A cultura estoque foi mantida em tubos inclinados contendo meio de cultura Agar Extrato de Levedura Czapek (CYA). Tubos e placas foram inoculados a 30 °C, por sete dias, e subsequentemente estocados a 4 °C.

Para os experimentos de produção, frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL do requerido meio foram inoculados com 5 discos de micélio (8 mm de diâmetro), retirados da margem da colônia de culturas cultivadas em placa de Petri, por sete dias, a 30°C. No fim do cultivo submerso (336 horas), o meio fermentado foi filtrado e o sobrenadante foi congelado em freezer a -70 C, para ser usado nos estudos de partição.

6.3.3 Composição do meio

Para a manutenção do micro-organismo e inóculo, o meio CYA, com a seguinte composição (g/L água deionizada), foi utilizado: K₂HPO₄ (1,0), extrato de levedura (5,0), sacarose (30,0), Ágar (15,0) e 10 ml/L de Czapeck concentrado [NaNO₃ (30,0 g), KCl (5,0 g), MgSO₄.7H₂O (5,0 g), FeSO₄.7H₂O (0,1 g), água deionizada q.s.p. 100 mL] (PITT, 1985). A composição do meio de produção foi similar à utilizada no inóculo, exceto pelas concentrações de sacarose e de extrato de levedura, que foram 48,90 e 11,80, respectivamente. O pH do meio foi ajustado para 4,5 com HCl (5 M) e autoclavado a 121°C, por 15 minutos.

6.3.4 Geração de CGA

As soluções de surfactantes de SDS, Tween 20 e CTAB pH 6,9 foram preparadas em água deionizada. A solução de CTAB pH 8,0 foi preparada em tampão McIlvaine enquanto que as soluções de CTAB pH 9,0 e 10,0 foram preparadas em tampão Bicarbonato-Carbonato de Sódio. As soluções de SDS e CTAB foram preparadas para a concentração final de 2 mM e a Tween 20 de 20 mM. As CGA foram geradas pela agitação de 300 mL da solução de cada um dos surfactantes a 8.000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, usando agitador de alta velocidade.

6.3.5 Caracterização das CGA

6.3.5.1 *Gas hold up*

A *Gas hold up* (ϵ) foi determinada segundo a metodologia descrita por Amiri e Woodburn (1990). Depois da geração da CGA, estas foram transferidas para uma proveta graduada de 1.000 mL e o volume da fase líquida clara, abaixo da dispersão de CGA, foi medido em intervalos de 1 minuto. Após a dispersão colapsar, o volume total de líquido drenado (V_{l0}) foi medido, o qual correspondeu ao volume inicial da solução de surfactante (DERMIKI *et al.*, 2009). Os experimentos foram realizados em triplicata.

O *gas hold-up* (ϵ) foi definido como a taxa do volume na fase *aphron* (V_{aphron}), pelo volume da fase da dispersão (V_{a0}), de acordo com a equação 19:

$$\epsilon = \frac{V_{aphron}}{V_{a0}} = \frac{V_{a0} - V_{l0}}{V_{a0}} \times 100 (\%) \quad \text{equação 19}$$

6.3.5.2 Estabilidade

A estabilidade da CGA foi avaliada pela medida do tempo de meia vida da dispersão. O tempo de meia vida (τ , equação 6) foi definido como o tempo requerido para drenar metade inicial de líquido na dispersão ($V_{l0}/2$). Os experimentos foram realizados em triplicata (FUDA *et al.*, 2005, DERMIKI *et al.*, 2009).

$$\tau = \frac{V_{l0}}{2} \quad \text{equação 20}$$

6.3.6 Recuperação dos colorantes vermelhos a partir do meio fermentado de *Penicillium purpurogenum* usando CGA

Para os experimentos de partição, uma coluna de flotação feita de vidro (0,04 m de diâmetro interno e 0,5 m em altura) foi utilizada. Inicialmente, o meio fermentado à absorvância de 2,00 UA_{490nm} (a absorvância foi padronizada em todos os experimentos para minimizar os erros) foi introduzido na coluna em volume apropriado segundo a razão volumétrica (V_R). As CGA foram geradas pela agitação da solução de surfactante a 8.000 rpm por 5 minutos usando um

agitador de alta velocidade (Silverstone SL2T). Após este período, a velocidade foi ajustada e mantida a 6.000 rpm, para prevenir a formação de creme e evitar danos na estrutura da CGA (MANSUR *et al.*, 2006). Uma bomba peristáltica (Watson e Marlow 502S) foi utilizada para introduzir a CGA dentro da coluna a diferentes fluxos, de acordo com a equação 6, alterando, desta maneira, o tempo de contato entre o meio fermentado e o surfactante. Uma vez que a coluna estava completa, a mistura foi mantida em repouso por 10 minutos antes de separar a fase líquida (*bottom*) da fase *aphron* (*top*). Os volumes de ambas as fases foi medido.

Inicialmente, os experimentos foram conduzidos a razões volumétricas (R, equação 21) entre 3 e 18 para os surfactantes SDS, Tween 20 e CTAB pH 6,9. Na segunda etapa do trabalho, os experimentos foram conduzidos a razões volumétricas de 6 e 12. Para a segunda etapa, duas estratégias foram avaliadas: CGA geradas com CTAB a diferentes níveis de pH (6,9, 8,0, 9,0 e 10,0) e com Tween 20, sendo que nestes o meio fermentado foi parcialmente dissolvido em etanol (20:80 e 40:60) e em Tween 20 (20:80, 40:60, 60:40).

$$V_R = \frac{V_{CGA}}{V_{MF}} = \frac{\text{Taxa de fluxo} \times \text{tempo de contato}}{V_{MF}} \quad \text{equação 21}$$

O teor de açúcar, proteínas totais e colorantes vermelhos foi determinado em cada uma das fases. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os coeficientes de partição e de seletividade, em termos de açúcares e proteínas, foram calculados.

O comportamento da partição dos colorantes vermelhos em CGA foi determinado em termos de recuperação na fase *aphron* (η_{FA} , equação 22) e coeficiente de partição (K , equação 23):

$$\eta_{FA} = \frac{(Abs_{490})_{FA} \times (V_{FA}) - (Abs_{490})_{FL} \times (V_{FL})}{(Abs_{490})_{MF} \times (V_{MF})} \times 100 \quad \text{equação 22}$$

$$K = \frac{(Abs_{490})_{FA}}{(Abs_{490})_{FL}} \quad \text{equação 23}$$

em que: $(Abs_{490})_{MF}$, $(Abs_{490})_{FA}$ e $(Abs_{490})_{FL}$ são a absorbância dos colorantes vermelhos a 490 nm no meio fermentado inicial, na fase *aphron* e na fase

líquida, respectivamente. V_{FA} , V_{FL} e V_{MF} são os volumes na fase *aphron*, fase líquida do meio fermentado inicial, respectivamente.

A seletividade da separação dos colorantes naturais em relação a proteínas (Se_{PROT}) e açúcares (Se_A) é definida como:

$$Se_{PROT} = \frac{K_{CGA}}{K_{PROT}} = \frac{K_{CGA}}{\frac{P_{FA}}{P_{FL}}} \quad \text{equação 24}$$

$$Se_A = \frac{K}{K_A} = \frac{K}{\frac{A_{FA}}{A_{FL}}} \quad \text{equação 25}$$

em que: K_{CGA} é o coeficiente de partição dos colorantes vermelhos, K_{PROT} e K_A são os coeficientes de partição em termos de proteínas e açúcares, respectivamente. P_{FA} e P_{FL} são a concentração de proteínas na fase *aphron* e na fase líquida, respectivamente. A_{FA} e A_{FL} é a concentração de açúcares na fase *aphron* e na fase líquida, respectivamente.

6.3.7 Interação entre os colorantes vermelhos e os surfactantes

A interação entre os colorantes vermelhos e os surfactantes foi avaliada pela medida da absorvância de suas misturas. Os experimentos foram realizados da seguinte maneira: 5 mL de solução de surfactante (Tween 20 (20 mM), SDS (2 mM) e CTAB (2 mM) nos níveis de pH 6,9, 8,0, 9,0 e 10,0) foram misturados a um dado volume do meio fermentado para a absorvância final de 2,00 UA_{490nm} . As soluções foram homogeneizadas em uma cubeta, seladas com plástico filme e inseridas em banho termorregulado a 25°C. A absorvância das soluções foi determinada a 0, 1, 3, 6 e 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados. A percentagem de colorantes presentes na solução foi calculada de acordo com a equação 26:

$$CO(\%) = \frac{CO_{sol}}{CO_{ini}} \times 100 \quad \text{equação 26}$$

em que CO corresponde à percentagem de colorantes que resistiu ao tratamento, CO_{sol} à absorvância remanescente na solução, no respectivo intervalo de tempo, e CO_{ini} é a absorvância inicial do meio.

6.3.8 Solubilidade relativa dos colorantes vermelhos em solventes orgânicos

O estudo da solubilidade dos colorantes vermelhos em diferentes solventes orgânicos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Craft e Soares (1992), com algumas modificações. Os solventes analisados foram: etanol, metanol, etil acetato, propanol e hexano. Os experimentos foram realizados pela adição de 0,5 mL de meio fermentado com a absorvância ajustada para 2,00 UA_{490nm} em um dos solventes listados acima. As amostras foram agitadas por 15 minutos. Após esse período, cada solução foi filtrada através de membrana Millipore de 0,2 μm e diluições apropriadas foram realizadas, de forma que a absorvância permanecesse na faixa de 0,5 a 1,0. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os desvios padrões e os intervalos de confiança foram calculados. O limite de significância para a análise estatística foi para o intervalo de confiança de 95%.

6.3.9 Coeficiente de partição octanol-água

O coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) é uma propriedade física de um componente que tem frequentemente sido relacionada com seu comportamento biológico. Este coeficiente é uma propriedade do sistema de duas fases, no qual a água e o octanol estão em equilíbrio à temperatura fixa (25 °C) e a substância é distribuída entre a fase rica em água e a fase rica em octanol. K_{OW} é definido como a taxa de equilíbrio da concentração da substância na fase rica em água e rica em octanol (equação 27). Este parâmetro é calculado a partir do comportamento lipofílico/hidrofílico da substância e tende a ser maior para compostos com estruturas extensivamente não-polares, como cadeias longas ou hidrocarbonetos com multianéis, e menor para componentes com grupo altamente polares (BHAT *et al.*, 2002).

$$K_{OW} = \frac{Abs_{FO}}{Abs_{FA}}$$

equação 27

em que: Abs_{FO} e Abs_{FA} referem-se à absorvância dos colorantes vermelhos a 490 nm na fase octanol e na fase aquosa, respectivamente. K_{OW}

Os experimentos para o cálculo do coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) para os colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* foram realizados a partir da metodologia “Shake flasks” (OECD, 1995). Antes da determinação do coeficiente de partição, 1-octanol e água foram saturados a 25 °C. Para tanto, dois Erlenmeyers, um contendo 1-octanol e quantidade suficiente de água e o outro contendo água e quantidade suficiente de octanol, foram saturados em agitador orbital (shaker) durante 24 horas/125 rpm. Então, 2 mL de meio fermentado (2,00 UA_{490nm}), na faixa de pH entre 4,0 e 10,0, foram adicionados a 3 diferentes volumes de octanol e água (0,5, 1,0 e 2,0). A separação das fases foi realizada por centrifugação (5.000 rpm durante 15 minutos e a 25°C). A absorvância dos colorantes vermelhos foi determinada em ambas as fases e os resultados expressos como logaritmo do coeficiente de partição octanol-água (LOG K_{OW}), já que esta última maneira é a mais reportada na literatura (OECD, 1995).

6.3.10 Métodos analíticos

6.3.10.1 Determinação dos colorantes vermelhos

Os colorantes vermelhos foram estimados por análise espectrofotométrica pela leitura da absorvância a 490 nm, que corresponde à máxima absorvância para os colorantes vermelhos (JOHNS; STUART, 1991). Para determinar o comprimento de onda de absorvância máxima dos colorantes vermelhos, o meio fermentado foi varrido na faixa de 220 a 600nm, em cubeta de 1 cm, à temperatura ambiente. Então, a absorvância dos colorantes vermelhos foi fixada a 490 nm.

6.3.10.2 Determinação da concentração de proteína total

A concentração de proteínas totais foi determinada através do método BCA (Bicinchonic Acid) compatível com surfactantes. 100µL de amostra contendo proteínas e 2 mL do reagente BCA, preparado de acordo com as instruções do fabricante, foram adicionados ao teste tubo. Depois de 30

minutos, a densidade óptica a 562 nm foi determinada em espectrofotômetro usando água deionizada como branco. A curva de calibração correlacionando a densidade óptica com a concentração de proteína foi construída usando soluções de albumina de soro bovino (BSA) na faixa de 0 a 1 mg/mL.

6.3.11 Determinação de açúcar total

A concentração de açúcar total foi medida usando um instrumento refratômetro. O índice de refração do instrumento foi fornecido usando 800 μ l de cada amostra. Soluções de sacarose e D-glicose foram usadas como padrão.

6.4 Resultados e discussão

6.4.1 Caracterização de CGA

O objetivo deste estudo foi recuperar os colorantes vermelhos do meio fermentado de *P. purpurogenum* usando CGA gerada por diferentes tipos de soluções de surfactantes. Todavia, antes foi importante estudar as características da CGA sobre várias condições. As dispersões de CGA foram caracterizadas em termos de gas hold-up (ϵ) e estabilidade, este último em termos de tempo de meia vida (τ). O tempo de agitação e a velocidade de geração foram mantidos constantes a 5 minutos e 8.000 rpm, respectivamente, nestes experimentos. O efeito dos surfactantes SDS (aniônico), Tween 20 (não-iônico) e CTAB (catiônico), este último em diferentes níveis de pH (6,9, 8,0 9,0 e 10,0), nas propriedades das CGA foi avaliado.

Como pode ser observado, na Tabela 19, diferentes surfactantes não levaram a significativas mudanças no *gas hold-up*, que permaneceu ao redor de 65%. Os resultados obtidos com CTAB em diferentes valores de pH estão de acordo com os reportados por Fuda *et al.* (2005), que realizaram experimentos com este mesmo surfactante nos seguintes valores de pH: 4, 6 e 8 - e não encontraram mudanças significativas nas propriedades da CGA com uma alteração deste parâmetro.

Tabela 19. Efeito dos surfactantes SDS (2 mM), Tween 20 (20 mM) e CTAB (2mM, pH 6,90, 8,0, 9,0 e 10,0) na caracterização das CGA.

Surfactante	Gas hold-up, (ϵ ,%)	Tempo de meia vida, (τ ,s)
SDS (2 mM)	65,96 \pm 1,66	348,80 \pm 29,93
Tween 20 (20 mM)	64,66 \pm 0,74	553,40 \pm 11,83
CTAB (2 mM)	pH 6,9	402,38 \pm 33,53
	pH 8,0	381,25 \pm 5,46
	pH 9,0	407,20 \pm 19,95
	pH 10,0	454,00 \pm 23,86

A respeito do tempo de meia vida, SDS mostrou a menor estabilidade, o que pode ter ocorrido devido às características aniônicas deste surfactante. O CTAB, independentemente do pH avaliado, mostrou menor estabilidade quando comparado ao Tween 20. Desta maneira, o Tween 20 mostrou a maior estabilidade, com resultados 59 e 45% superiores aos valores obtidos para o SDS e o CTAB (pH 8,0). Esta última condição foi a que resultou nos menores valores de estabilidade entre os níveis de pH estudados para o CTAB.

A maior estabilidade do Tween 20, quando comparado com os outros surfactantes, pode ser devido à concentração usada deste surfactante, que foi 10 vezes superior à utilizada para os demais. Esta concentração foi determinada porque, em geral, para produzir CGA estável, é necessário que a concentração do surfactante exceda sua Concentração Micelar Crítica (CMC), já que sob estas condições a viscosidade da fase líquida cristalina na solução “*bulk*” é formada e a drenagem da bolha é retardada (DERMIKI *et al.*, 2009; ROSEN, 2004).

Como citado por Dermiki *et al.* (2009), para surfactantes não iônicos, como o Tween 20, altas concentrações de surfactantes são necessárias para produzir soluções de surfactantes estáveis. Isto pode ser atribuído à maior área de superfície por molécula e à ausência de filmes de superfície altamente carregados nos filmes produzidos por este tipo de surfactante (DERMIKI *et al.*, 2009; ROSEN, 2004). Além disso, o aumento na concentração do surfactante geralmente estabiliza a *aphron*, por aumentar a pressão de separação que se refere à força repulsiva que opõe o fino filme que se localiza entre as bolhas (SPIGNO *et al.*, 2010).

A concentração de 2 mM para o CTAB foi encontrada como a melhor para o CTAB por nosso grupo de pesquisa. Porém, estudos comparando as

características da CGA para este surfactante nos níveis de pH 6,9, 8,0, 9,0 e 10,0 não haviam sido realizados. Comparando os resultados obtidos nesta pesquisa, o pH 10,0 mostrou gerar a CGA mais estável; estes resultados demonstram que, em condições alcalinas, as *aphrons* geradas por CTAB são mais estáveis do que em condições neutras ou ácidas.

6.4.2 Interação entre os colorantes vermelhos e os surfactantes

Surfactantes são moléculas utilizadas para muitos fins em quase todos os setores da indústria moderna. Além disso, alguns deles são permitidos para uso em diversas formulações nas indústrias petroquímica, química, farmacêutica, alimentícia, cosmética e têxtil (MITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os surfactantes têm particular importância nas indústrias farmacêutica e alimentícia em função de sua habilidade em aumentar a solubilidade de substâncias insolúveis à água (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2005). Desta maneira, é interessante utilizar um surfactante para a recuperação dos colorantes vermelhos, no qual estes são solúveis e estáveis para possivelmente criar um processo integrado de coloração e solubilização. Além disso, a estabilidade da cor frente ao surfactante é um importante parâmetro para diminuir as perdas durante os estudos de partição.

A estabilidade dos colorantes vermelhos frente aos surfactantes Tween 20 (20 mM), SDS (2 mM) e CTAB (2 mM), nos níveis de pH 6,9, 8,0, 9,0 e 10,0, foi determinada após 1, 3, 6 e 24 horas de estocagem e os resultados estão apresentados na Figura 33. Os experimentos foram realizados a 25°C, que é a mesma temperatura dos experimentos de partição.

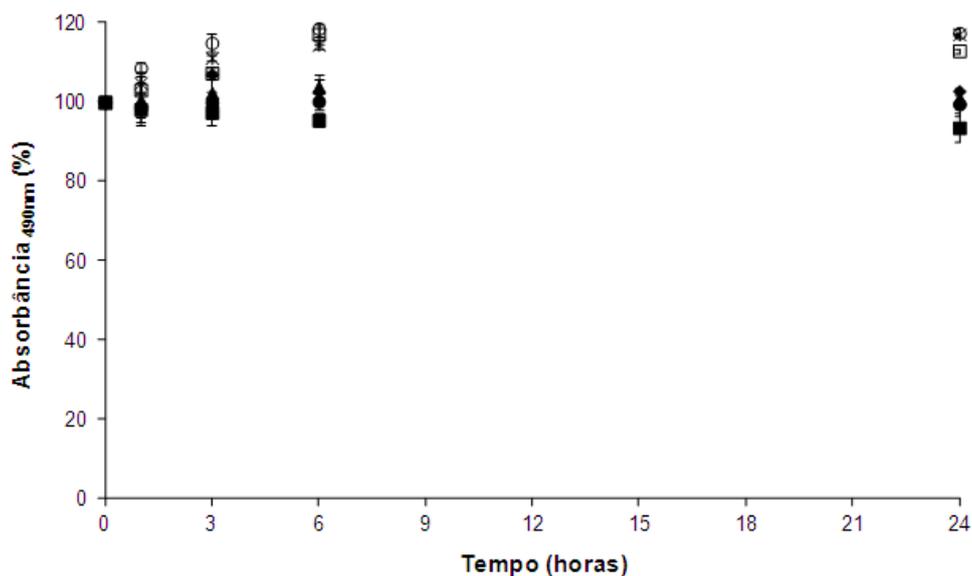


Figura 33. Estabilidade dos colorantes vermelhos na presença de diferentes surfactantes e ao longo de 24 horas: controle (sem surfactante, ◆), Tween 20 mM (■), SDS 2 mM (▲), CTAB 2 mM [pH 6,9 (●), pH 8,0 (*), pH 9,0 (□), pH 10,0 (○)]. Todos os ensaios foram realizados a 25°C. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Os colorantes vermelhos presentes no meio fermentado mostraram estabilidade próxima a 100% frente aos surfactantes, quando comparado com a condição controle (sem a presença dos surfactantes). Todavia, foi observado aumento nos valores da absorbância com o surfactante CTAB nos níveis de pH 8,0, 9,0, e 10,0 ao longo do tempo. A absorbância permaneceu estável, após 6 horas de estocagem, e aproximadamente 15% maior do que o valor obtido no experimento controle. Este comportamento pode ter ocorrido devido a algum tipo de associação ou formação de um complexo entre os colorantes vermelhos e os monômeros dos surfactantes (GOKTURK, 2005; SARKAR, PODAR, 2000). Estes resultados estão em boa concordância com a literatura. Gokturk (2005) estudou o efeito da hidrofobicidade na ligação micelar do ácido carmínico, um corante aniônico, com diferentes surfactantes e encontrou que esta molécula forma um complexo surfactante-corante dependendo da condição estudada.

Além disso, como reportado por Rangel-Yagui e Pessoa-Jr (2005), o pH de soluções micelares pode mostrar influência significativa na extensão da solubilização e da estabilização de biomoléculas, desde que este parâmetro possa mudar o equilíbrio entre os íons e a forma molecular de alguns compostos. Em relação aos surfactantes iônicos, como o CTAB e o SDS, além

das interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas são também muito importantes para a ligação entre os colorantes e os surfactantes (GOKTURK, 2005).

Estes resultados demonstram que os colorantes vermelhos apresentam boa estabilidade frente aos surfactantes avaliados. Além disso, uma possível interação entre os colorantes vermelhos e o surfactante não é um problema para a leitura da absorbância nos estudos de extração, porque, nestes experimentos, o tempo de contato será menor que 1 hora e a leitura da absorbância é realizada assim que os experimentos são finalizados.

6.4.3 Solubilidade e coeficiente de partição octanol-água dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *Penicillium purpurogenum* em diferentes solventes

Como mencionado anteriormente, os colorantes produzidos por fungos do gênero *Monascus* são solúveis em água. A partir da literatura (MAPARI *et al.*, 2008), sabe-se que fungos do gênero *Penicillium* podem produzir colorantes com estrutura química similar aos produzidos por *Monascus*. Deste modo, era esperado que os colorantes produzidos por *P. purpurogenum* fossem solúveis em água.

Desta maneira, o estudo de algumas propriedades dos colorantes vermelhos produzidos por cultivo submerso de *P. purpurogenum*, em relação à sua solubilidade relativa em etanol, metanol, etil acetato, propanol e hexano (Figura 34) e seu coeficiente de partição octanol-água (Figura 35), foram determinados.

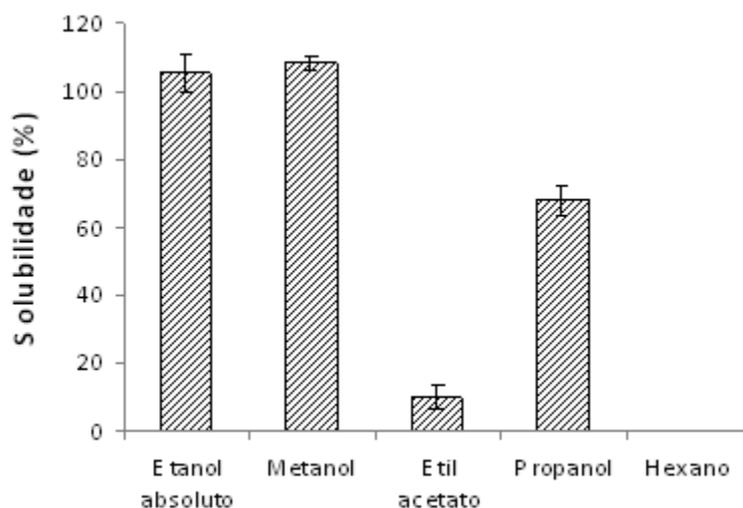


Figura 34. Solubilidade dos colorantes vermelhos obtidos por cultivo submerso de *P. purpurogenum* em diferentes solventes. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Os colorantes vermelhos foram mais solúveis em solventes orgânicos de maior polaridade (etanol e metanol). Todavia, em propanol, um solvente orgânico polar, a solubilidade foi de aproximadamente 70%. A menor solubilidade dos colorantes vermelhos frente ao propanol, quando comparado com os outros álcoois avaliados, pode ser explicada em função de sua maior cadeia carbônica e, conseqüentemente, menor polaridade relativa. Os colorantes vermelhos foram completamente insolúveis em hexano, um solvente apolar, e parcialmente miscível em etil acetato. Estes resultados evidenciam característica mais hidrofílica dos referidos colorantes.

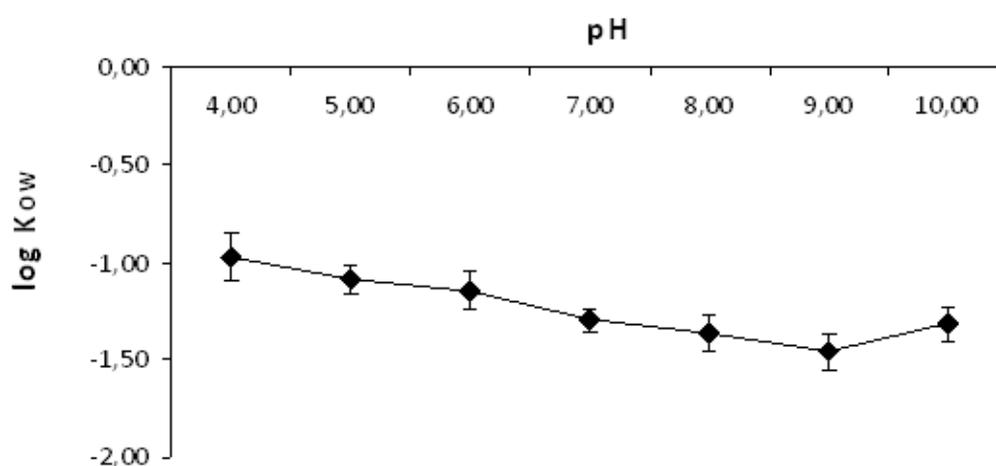


Figura 32. Log K_{OW} dos colorantes vermelhos obtidos do meio fermentado de *P. purpurogenum* em uma faixa de pH de 4,0 a 10,0. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A equação 27 (Materiais e Métodos) mostra que se o soluto estiver em grande quantidade na fase orgânica (característica hidrofóbica), o coeficiente de partição octanol-água tem valor maior do que 1. Todavia, se o soluto estiver em maior quantidade na fase aquosa, isto significa que ele apresenta características mais hidrofílicas e o coeficiente de partição octanol-água terá valores inferiores a 1 com $\log K_{OW}$ negativos.

Assim, os $\log K_{OW}$ obtidos para os colorantes vermelhos apresentaram valores negativos, o que significa que estas biomoléculas apresentam características visivelmente hidrofílicas. Uma faixa de pH (4-10) foi estudada, porque, no método “*flasks*” (OECD, 1995), os resultados poderiam ser influenciados por esta variável. Os resultados obtidos mostram que o pH tem pequena influência no coeficiente de partição octanol-água. Todavia, este parâmetro diminuiu com o aumento do pH e, ao se trabalhar com este parâmetro a 9,0, obteve-se os menores de valores de $\log K_{OW}$.

Os resultados reportados acima confirmam que os colorantes vermelhos presentes no meio fermentado têm características mais hidrofílicas do que hidrofóbicas, que pode criar uma estratégia para melhorar a extração dos colorantes vermelhos do meio fermentado de *P. purpurogenum*.

6.4.4 Partição dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado

Dependendo da estrutura química dos bioprodutos, o grupamento iônico do surfactante pode ter grande influência na recuperação. Além disso, a partição pode ser mais seletiva se surfactantes carregados forem utilizados (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003). A esse respeito, interações eletrostáticas entre as biomoléculas carregadas e os surfactantes com carga oposta podem ser exploradas para aumentar o rendimento e a seletividade usando *Colloidal gas apheresis* (CGA). Embora a estrutura química principal dos colorantes presentes no meio fermentado não tenha sido identificada ainda, nós assumimos que os colorantes contêm moléculas estruturais similares àqueles do N-glutarilmonascorubramina e do N-gutarilrubropunctamina (Figura 31). Além disso, estas moléculas teriam alta densidade eletrônica e então estariam negativamente polarizadas. Assim, um surfactante carregado positivamente

permitirá maior recuperação, porque se cria ambiente atrativo para biomoléculas.

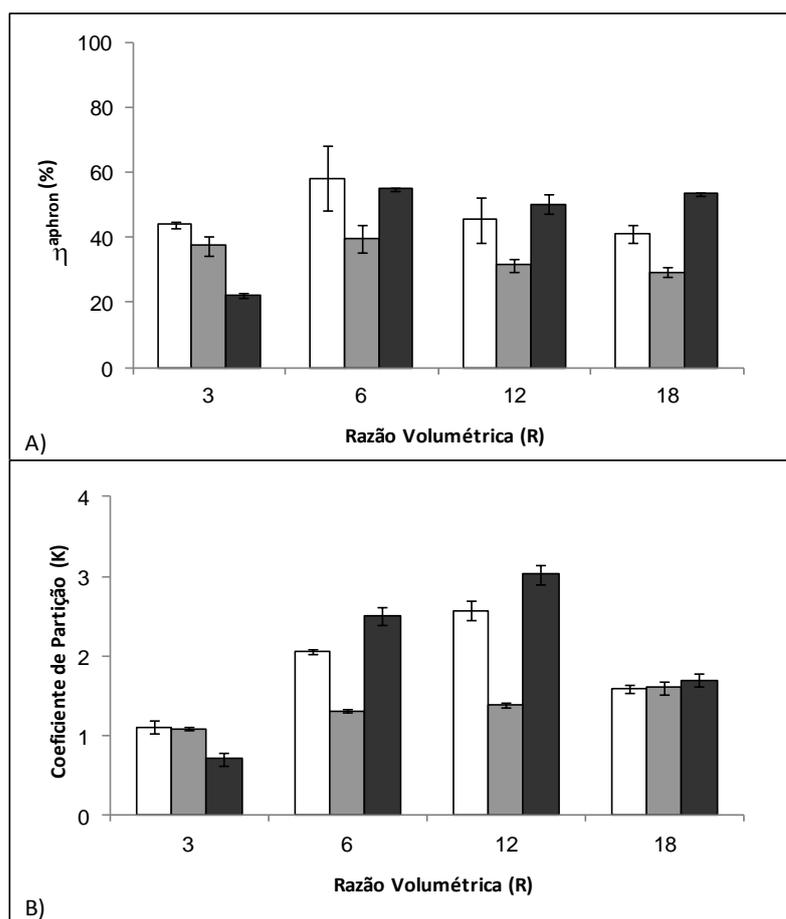


Figura 33. Comparação da recuperação (A) e do coeficiente de partição (B) dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* usando CGA geradas por Tween 20, 20 mM (barras brancas), SDS 2 mM (barras cinzas) e CTAB 2 mM (barras pretas) como uma função da razão volumétrica. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Como pode ser observado na Figura 33A, a maior recuperação (78,83%) foi obtida com Tween 20. Comparando este resultado com os obtidos pelos outros surfactantes na mesma V_{RATIO} , este valor é 50 e 27% maior do que os obtidos com SDS e CTAB, respectivamente. Por outro lado, considerando o coeficiente de partição (Figura 33B), o maior valor (3,00) foi obtido com CTAB seguido de Tween 20 e SDS. O maior coeficiente de partição obtido com CTAB mostra que este surfactante pode promover a concentração dos colorantes vermelhos na fase *aphron*. De maneira geral, os valores dos parâmetros de extração com Tween 20 e CTAB foram maiores do que com SDS, o que está de acordo com nossa hipótese de que os colorantes vermelhos têm estrutura negativamente carregada, devido a sua atração pelo surfactante catiônico.

Então, isso sugere que tanto as interações eletrostáticas quanto hidrofóbicas desempenham importante papel na recuperação dos colorantes vermelhos por CGA.

A razão volumétrica mostrou ser um importante parâmetro de operação em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa (ALVES *et al.*, 2006; DERMIKI *et al.*, 2009, 2010; FUDA; JAUREGI, 2006). Desta maneira, foi avaliada a faixa entre 3 e 18 neste trabalho. De acordo com os resultados mostrados na Figura 36, o aumento na razão volumétrica teve grande influência, principalmente com os surfactantes CTAB e Tween 20. A razão volumétrica de 3 gerou as menores recuperações para todos os surfactantes avaliados, talvez porque, nesta condição, houve baixa concentração de surfactantes em solução, o que faz o contato entre os surfactantes e as moléculas de colorantes mais difícil. Este comportamento pode ser confirmado pela Figura 36B, que mostra que o aumento na razão volumétrica de 3 para 6 e 12 pode promover aumento na recuperação e no coeficiente de partição. O aumento na razão volumétrica significa que mais moléculas de surfactantes estão disponíveis para a recuperação (DERMIKI *et al.*, 2010). Todavia, os baixos resultados obtidos na razão volumétrica de 18 podem ser explorados, baseando-se na competição entre CGA e as micelas para agregar ou solubilizar os colorantes. Quanto mais colorantes estão solubilizados nas micelas, menor a partição para a fase *apron*. Nos sistemas estudados, esta situação pode ser observada na razão volumétrica de 18 para o CTAB e Tween 20, em que os menores coeficientes de partição foram obtidos. Desta maneira, alta concentração de surfactantes em solução pode promover queda na partição.

Como Tween 20 e CTAB mostraram os melhores resultados, estes surfactantes foram escolhidos para mais estudos sob novas condições. A recuperação com CTAB foi investigada a diferentes níveis de pH (6,9, 8,0, 9,0 e 10,0). Para o Tween 20, os colorantes vermelhos dissolvidos em etanol e Tween 20 foram estudados. Além disso, baseados nos resultados apresentados acima, os experimentos seguintes foram realizados na razão volumétrica de 6 e 12.

6.4.5 Partição dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado usando CGA gerada por CTAB 2 mM: efeito do pH

Nos resultados apresentados previamente, foi demonstrado que para o surfactante CTAB as forças que, provavelmente, dirigiram o processo de partição foram as interações eletrostáticas entre as moléculas dos colorantes vermelhos e do surfactante. Levando este fato em consideração, experimentos foram realizados em uma faixa de valores de pH (6,9, 8,0, 9,0 e 10,0). Além disso, estudos de estabilidade dos colorantes a diferentes níveis de pH (3-10) mostraram que estes colorantes são mais estáveis em condições básicas, principalmente no pH 8,0. Desta maneira, o efeito do pH na recuperação dos colorantes e o coeficiente de partição estão apresentados nas Figuras 37A e 37B, respectivamente.

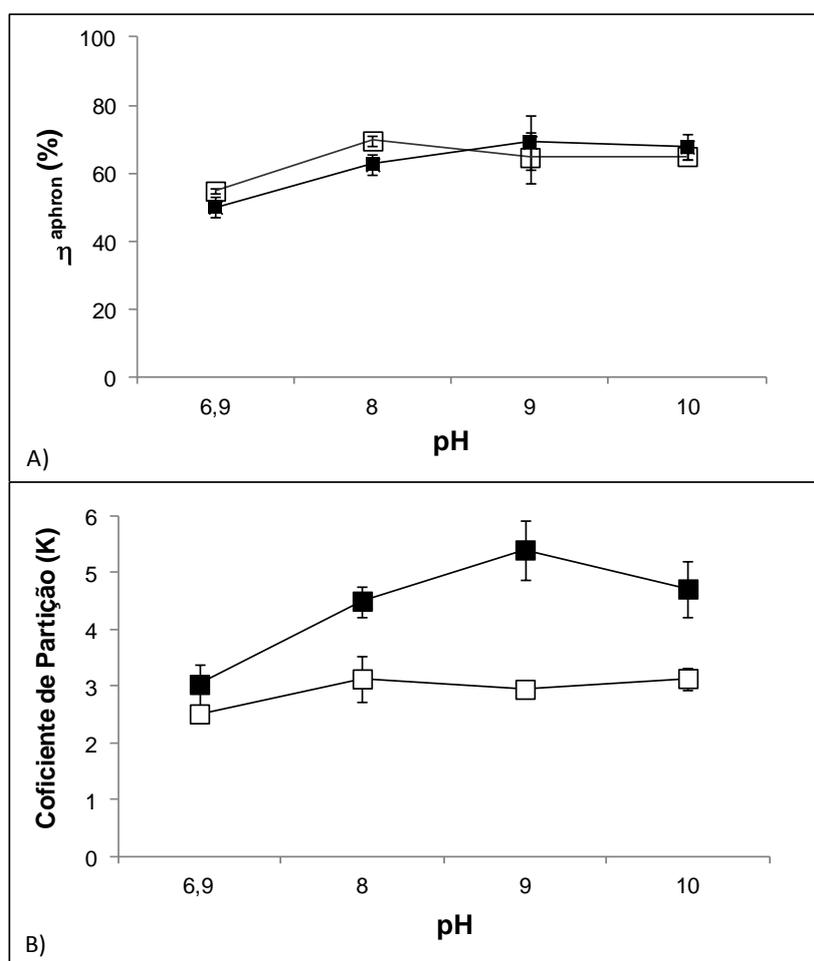


Figura 34. Estudo do efeito do pH na recuperação na fase *aphron* (η_{aphron} , A) e do coeficiente de partição (K, B) dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* através de CGA geradas por CTAB 2 mM na razão volumétrica de 6 (\square) e 12 (\blacksquare). Os surfactantes foram dispersos em água (pH 6,9), tampão McIlvaine (pH 8,0) e tampão carbonato-bicarbonato de sódio (pH 9,0 e 10,0). As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Os resultados de η_{aphron} na Figura 37A revelam que não houve diferenças significativas para este parâmetro na faixa de pH entre 8,0 e 10,0. O valor obtido para a η_{aphron} foi próximo a 70%, nestes valores de pH, e menor do que 60%, no pH 6,9, o que demonstra a influência deste parâmetro na recuperação, ao se trabalhar com surfactante catiônico. Este comportamento pode ser explicado do ponto de vista da mudança estrutural dos colorantes vermelhos sob condições mais alcalinas. Como pode ser observado na Figura 34B, maiores valores de K foram obtidos na razão volumétrica de 12. Altas razões volumétricas correspondem a maiores taxas molares dos surfactantes durante a alimentação do sistema, resultando em mais moléculas de surfactantes disponíveis para a partição (DERMIKI *et al.*, 2010). Além disso, ao se trabalhar com o melhor valor de R para o surfactante catiônico, seu grupo iônico poderá ser atraído pela superfície negativamente carregada das partículas dos colorantes vermelhos e seus grupos hidrofóbicos podem ser orientados através da fase líquida, causando aumento da tensão superficial sólido-líquido e aumento do ângulo de contato entre o líquido e a superfície da partícula. Além disso, as partículas floculadas são expelidas para a interface ar-solução e sua recuperação na fase *aphron* é favorecida (DERMIKI *et al.*, 2009; ROSEN, 2004).

Considerando o parâmetro pH, o pH 9,0 favoreceu maiores valores de K, provavelmente devido aos colorantes vermelhos nesta situação estarem fortemente carregados com carga negativa. Além disso, estes resultados estão em concordância com os obtidos nos estudos de partição octanol-água, os quais mostraram que, no pH 9,0, os colorantes vermelhos apresentam características mais hidrofílicas. Levando em consideração os resultados apresentados acima, pode-se dizer que a partição dos colorantes vermelhos com CGA gerada por CTAB, um surfactante catiônico, é principalmente dirigida por interações eletrostáticas.

As medidas de seletividade em relação às proteínas (Se_P) (Tabela 20) foram influenciadas principalmente pela razão volumétrica. O valor superior de R (12) forneceu Se_P próximo a 3,0, valor 50% superior ao obtido para a razão volumétrica de 6. O pH 9,0 proporcionou os menores valores de Se_P em todas as condições avaliadas. É interessante notar que não somente os colorantes vermelhos, mas também as proteínas foram mais atraídos para a fase *aphron*. Todavia, estes resultados sugerem que, utilizando CGA, há parcial purificação

das proteínas presentes no meio fermentado, o que pode ser utilizado como primeira etapa de partição.

Tabela 20. Seletividade em relação às proteínas (Se_P) e aos açúcares (Se_A) em diferentes níveis de pH (6,9, 8,0, 9,0 e 10,0) e razões volumétricas (R, 6 e 12). Os erros correspondem a 95% do limite de confiança para as medidas.

pH	V_{LIQ}/V_{APHRON}		Se_P		Se_A	
	R		R		R	
	6	12	6	12	6	12
6,9	2,1	3,0	$1,94 \pm 0,16$	$2,18 \pm 0,25$	$2,04 \pm 0,01$	$3,02 \pm 0,36$
8,0	1,4	2,8	$2,32 \pm 0,18$	$3,18 \pm 0,36$	$3,12 \pm 0,40$	$5,39 \pm 0,61$
9,0	1,6	2,4	$2,02 \pm 0,18$	$3,75 \pm 0,49$	$3,67 \pm 0,31$	$7,20 \pm 0,48$
10,0	1,5	2,2	$2,17 \pm 0,16$	$3,04 \pm 0,49$	$3,13 \pm 0,19$	$4,71 \pm 0,48$

A seletividade em relação aos açúcares totais presentes no meio fermentado (Se_A), Tabela 20, foi fortemente influenciada tanto pelo pH quanto pelo R. Para R igual a 12 e pH 9,0 foi obtido Se_A de 7,2, o que corresponde a valores 138, 33 e 53% superiores em relação aos obtidos para os níveis de pH 6,9, 8,0 e 10,0, respectivamente. Isto é devido a interação mais forte dos colorantes vermelhos pelo CTAB do que pelos açúcares presentes no meio fermentado.

Como citado por Dermiki *et al.* (2010), um mecanismo diferente é responsável pela separação das partículas de diferentes tamanhos em coluna de flotação: a adsorção de pequenas partículas nas bolhas é dirigida principalmente por interações eletrostáticas, enquanto que o atachamento das células/agregados de células para as bolhas ocorre predominantemente devido à força de flutuação que são dependentes das propriedades das partículas, como o tamanho e a densidade das moléculas (DERMIKI *et al.*, 2010; KLIMPEL, 1998; NGUYEN; SCHULZE, 2004).

Quanto maior a seletividade, melhor a separação da biomolécula alvo. As CGA geradas por CTAB produziram bons resultados, principalmente a pH 9,0. Futuras investigações analisando tempo de drenagem e diferentes concentrações podem ser realizadas visando melhorar os resultados acima. De qualquer maneira, os resultados apresentados com CTAB já demonstram o potencial desta estratégia de purificação.

6.4.6 Partição dos colorantes vermelhos, presentes no meio fermentado, solubilizados em diferentes condições usando CGA gerada por Tween 20 (20 mM)

Como a partição dos colorantes vermelhos usando Tween 20 parece ser direcionada por interações hidrofóbicas, avaliou-se a estratégia de dissolver os colorantes em etanol e Tween 20 (20 mM). Para tanto, os colorantes vermelhos presentes no meio fermentado foram dispersos em Tween 20 (Figura 35), nas proporções: 20:80, 40:60 e 60:40, e em etanol (Figura 36) nas proporções: 20:80 e 40:60. Tais proporções correspondem à relação solvente/meio fermentado.

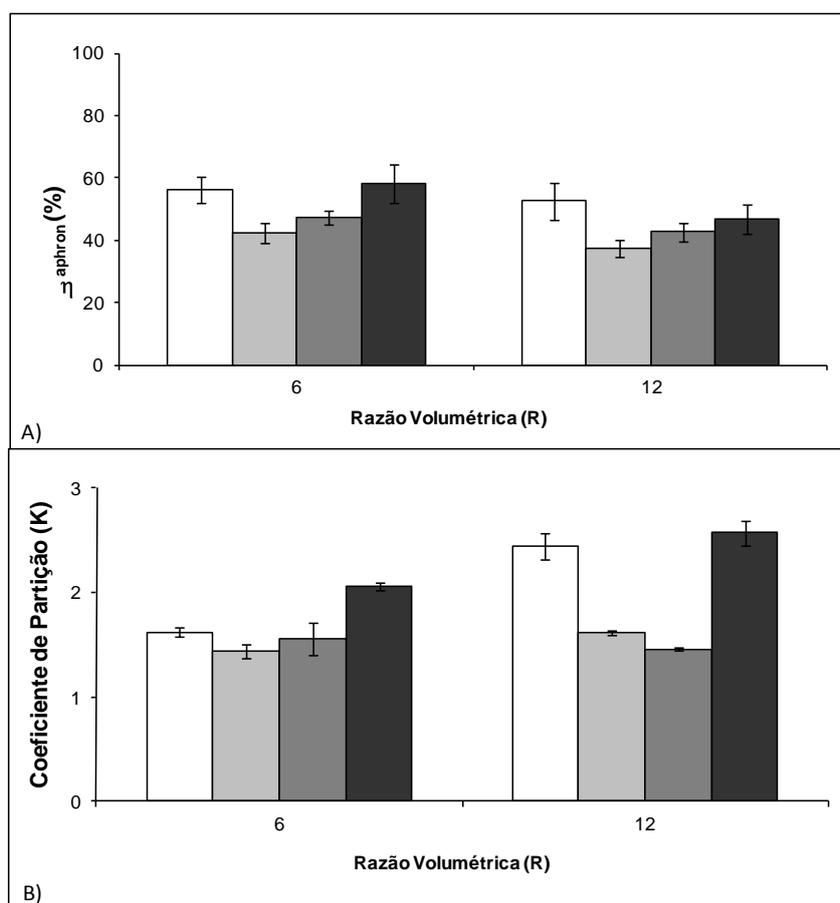


Figura 35. Recuperação na fase *aphron* (η_{aphron} , A) e coeficiente de partição (B) dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* dispersos em Tween 20 20 mM (%v/v): 20:80 (barras brancas), 40:60 (barras cinza claro), 60:40 (barras cinza escura) e sem diluição (barras cinza clara) usando CGA geradas por Tween 20, 20 mM na razão volumétrica de 6 e 12. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A dissolução parcial dos colorantes vermelhos em solução de Tween 20 (20 mM), antes do contato com CGA gerada por Tween 20, foi proposta porque, hipoteticamente, estas moléculas poderiam ficar cobertas pelo surfactante, resultando em aumento da recuperação. Como citado anteriormente, ao contrário da partição com o CTAB, a partição com o Tween 20 possivelmente é dirigida por interações eletrostáticas. Todavia, os resultados mostraram que os experimentos propostos não acarretaram nem em aumento da η_{aphron} nem do K. A única exceção foi a recuperação na proporção 20:80 e R igual a 12, mas, considerando-se as barras de erro, os valores obtidos foram similares. Para o K, a partir da Figura 38B, pode ser observado que o R de 12 gerou os maiores valores para este parâmetro na proporção 20:80 e no experimento sem diluição. Este comportamento pode ser explicado caso seja suposto que a recuperação é um parâmetro que considera o volume em ambas as fases e, como pode ser observado na Tabela 21, a taxa entre o volume na fase líquida (V_{LIQ}) e o volume na fase *aphron* (V_{APHRON}) nas condições citadas é 2 vezes superior para o R igual a 12. De qualquer maneira, a parcial dissolução dos colorantes vermelhos em solução de Tween 20 (20 mM) não promoveu os resultados esperados. Os melhores valores de η_{aphron} (58%, R=6) e K (2,6, R=12) foram obtidos nos experimentos padrões.

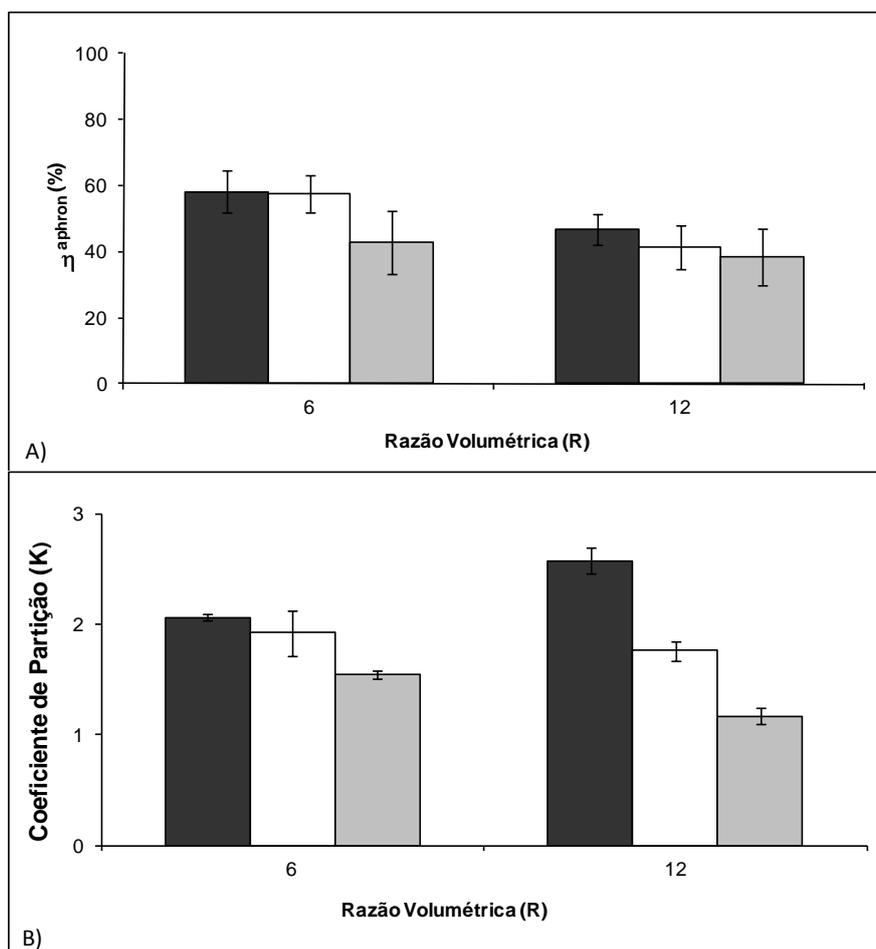


Figura 36. Recuperação na fase *aphron* (η_{aphron} , A) e coeficiente de partição (K, B) dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* dispersos em etanol (%v/v): 20:80 (barras brancas), 40:60 (barras cinza) e sem diluição (barras pretas) usando CGA geradas por Tween 20 (20 mM) na razão volumétrica de 6 e 12. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Adicionalmente, os colorantes vermelhos foram parcialmente dissolvidos em etanol. Como ocorreu com a dissolução em Tween 20, dissolver os colorantes vermelhos em etanol e elevar o volume percentual de etanol na solução não promoveu aumento nos valores dos parâmetros de extração. Um aumento no percentual de volume de etanol na solução levou a prejuízo em todos os parâmetros analisados. Save e Pangarkar (1994) citam que a adição de álcool acarreta em redução localizada na tensão superficial, causando desestabilização das CGA, o que pode ter ocorrido ao se trabalhar na proporção 40:60. O valor de K na condição controle (sem diluição) a R=12 foi 46% maior do que para o valor obtido com os colorantes vermelhos dispersos em etanol (20:80). A respeito da η_{aphron} , o valor de R igual a 6 promoveu os melhores resultados e os valores obtidos na condição controle e na proporção 20:80 foram similares ($\approx 58\%$).

A respeito da seletividade, a adição tanto de Tween 20 (1,73) quanto de etanol (1,52) produziu Se_P (Tabela 21) superior à condição controle (1,34), ambos na proporção 20:80 e R igual a 12. Todavia, o aumento na concentração destes solventes prejudicou este parâmetro. Os valores obtidos para a Se_A (Tabela 21) foram maiores na condição controle do que com a adição tanto de Tween 20 quanto de etanol, porém o segundo caso gerou os menores resultados.

Tabela 21. Seletividade em relação às proteínas (Se_P) e aos açúcares (Se_A) para os colorantes vermelhos dissolvidos em Tween 20 e etanol e sem diluição (condição controle) a diferentes razões volumétricas (R, 6 e 12). Os erros correspondem a 95% do limite de confiança para as medidas.

Condição experimental		V_{LIQ}/V_{APHRON}		Se_P		Se_A	
		R		R		R	
		6	12	6	12	6	12
Controle		1,5	3,2	$1,35 \pm 0,02$	$1,34 \pm 0,17$	$2,01 \pm 0,06$	$2,70 \pm 0,35$
Tween 20 (20 mM)	20:80	1,3	2,3	$1,22 \pm 0,07$	$1,73 \pm 0,17$	$1,62 \pm 0,08$	$2,60 \pm 0,24$
	40:60	2,0	2,7	$1,12 \pm 0,12$	$1,16 \pm 0,07$	$1,44 \pm 0,13$	$1,70 \pm 0,05$
	60:40	1,7	2,0	$1,22 \pm 0,25$	$1,11 \pm 0,03$	$1,86 \pm 0,11$	$1,77 \pm 0,16$
Etanol	20:80	2,0	2,7	$1,50 \pm 0,11$	$1,52 \pm 0,04$	$1,74 \pm 0,18$	$1,70 \pm 0,09$
	40:60	1,7	2,0	$1,29 \pm 0,09$	$1,22 \pm 0,08$	$1,50 \pm 0,03$	$1,23 \pm 0,08$

É interessante que não somente para o Tween 20, mas também para o CTAB, a razão volumétrica de 12 proporcionou os melhores resultados para alguns dos parâmetros de partição avaliados. Neste caso, este valor de R pode ser responsável pela melhor proporção entre os surfactantes e os colorantes vermelhos no sistema. Para o CTAB, pode ocorrer maior interação eletrostática entre os colorantes vermelhos e os monômeros do CTAB. Ademais, se a concentração dos surfactantes não for alta o suficiente para criar uma associação entre a porção hidrofílica e as moléculas colorantes, as últimas tendem a permanecer na fase líquida, que tem ambiente mais hidrofílico, gerando os piores resultados para os parâmetros de extração, já que o desejado é que a biomolécula-alvo migre para a fase *aphron*.

Apesar dos resultados de partição usando CTAB serem mais promissores do que com Tween 20, dependendo da aplicação dos colorantes vermelhos, o uso de Tween 20 é mais interessante do que o CTAB, devido à toxicidade do último. CTAB tem $LD_{50} = 410$ mg/kg, que é considerada bastante

alta para uso na indústria alimentícia, por exemplo, mas pode ser utilizada na indústria têxtil. Surfactantes não iônicos, como o Tween 20, podem ser vantajosos para uso porque eles são considerados não-tóxicos e são autorizados para serem utilizados na formulação de medicamentos, uma vez que não precisam ser removidos da fase *aphron* e, ao mesmo tempo, poderiam ajudar na formulação do produto final (JAUREGI; DERMIKI, 2010).

6.5 Conclusão

O comportamento da partição dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 em Colloidal Gas Aphrons, CGA, foi investigado experimentalmente. Estudos de solubilidade em diferentes solventes orgânicos e o coeficiente de partição octanol-água mostraram que os colorantes vermelhos têm características mais hidrofílicas. Além disso, foi demonstrado que a biomolécula alvo é estável frente aos surfactantes estudados. Adicionalmente, as maiores recuperações foram alcançadas com as CGA geradas por surfactantes catiônico e aniônico. Estes resultados indicam que os colorantes vermelhos são negativamente carregados e sua separação por CGA é dirigida tanto por interações eletrostáticas quanto hidrofóbicas. Uma vez que altas recuperações foram obtidas com os surfactantes CTAB e Tween 20, o melhor surfactante a ser usado no processo de recuperação pode ser selecionado de acordo com a aplicação dos colorantes vermelhos. Além disso, a seletividade da separação pode ser manipulada pela escolha ou do surfactante ou das condições físico-químicas. Finalmente, deve ser notado que este trabalho demonstra o potencial de CGA como uma nova etapa inicial de recuperação dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado.

7. CAPÍTULO VII

Estudo de variáveis que influenciam a produção de colorantes naturais por cultivo submerso de *Penicillium purpurogenum* em biorreator

Este artigo será submetido ao periódico *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, com fator de impacto igual a 2,735.

7.1 Resumo

Devido a problemas relacionados à toxicidade dos colorantes sintéticos usados atualmente, há interesse pela busca de novos colorantes naturais para serem aplicados em indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Dentro deste contexto, estão inseridos os colorantes naturais produzidos e/ou excretados por micro-organismos, como os fungos filamentosos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de colorantes naturais amarelos, laranjas e vermelhos por *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275, por cultivo submerso em biorreator. Inicialmente, diferentes velocidades de agitação (100 a 600 rpm), à taxa de aeração constante (2,0 vvm), foram analisadas. Os resultados demonstraram que baixas velocidades de agitação (100 e 150 rpm) promoveram o meio sem homogeneidade. Os melhores resultados foram obtidos nas velocidades de agitação de 300 e 500 rpm. Assim, novos estudos nestas velocidades de agitação e 2,0 vvm, variando o pH na fase de produção dos colorantes para 8,0, foram realizados. Iniciar o crescimento a pH 4,5 e basificar o mesmo após a depreciação da fonte principal de carbono, ou seja, na fase de produção dos colorantes, acarretou em aumento de 87% para os colorantes amarelos e próximos a 250% para os colorantes laranjas e vermelhos. Estes resultados demonstram o potencial não somente do uso de biorreatores para aumento de escala, mas também da estratégia aplicada visando à produção de colorantes naturais por fungos filamentosos.

Palavras-chave: colorantes naturais, fungos filamentosos, cultivo submerso, biorreator.

7.2 Introdução

Os fungos filamentosos são micro-organismos com vasta versatilidade metabólica, o que possibilita a utilização destes em diversos processos industriais, como a produção de ácidos orgânicos, polissacarídeos, enzimas, alcaloides, micotoxinas, antibióticos e pigmentos (EL-ENSHASY, 2007). O *Penicillium purpurogenum*, classe Ascomycetes, tem sido reportado como um novo produtor de colorantes naturais (MAPARI *et al.*, 2010; MÉNDEZ *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012; VELMURUGAN *et al.*, 2010a) quando cultivado tanto em meio sólido quanto em meio líquido (MÉNDEZ *et al.*, 2011). A produção destas biomoléculas por este micro-organismo é de grande interesse, pois há busca por novas fontes de colorantes naturais, desde que houve redução do número de colorantes sintéticos aprovados pelas agências reguladoras para aplicação industrial (BRITTON, 1999; PAN *et al.*, 2009).

Neste contexto, os interesses estão direcionados para fontes de colorantes naturais, devido a estes possuírem menores efeitos adversos à saúde e maior aceitabilidade pelos consumidores, quando comparado aos colorantes artificiais usados nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticas (DUFOSSÉ *et al.*, 2005; DZIEZAK, 1987; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

A produção de colorantes naturais por cultivo submerso em biorreator é um processo complexo, no qual diversas variáveis, tais como taxa de aeração, transferência de massa e calor, pH, estão inseridas. Em cultivo submerso, a morfologia fúngica é usualmente classificada em dois tipos: micélios filamentosos individuais e colônias esféricas densas, os chamados *pellets*. Micélios filamentosos permitem o meio de cultivo altamente viscoso e pseudoplástico, o que reduz a transferência de massa gás-líquido e a homogeneidade no biorreator (CUI *et al.*, 1998). Apesar de a forma de *pellets* gerar meio menos viscoso do que a forma com micélios filamentosos (BEROVIC *et al.*, 1991), ainda assim, pode haver transferência de massa interna limitada (CUI *et al.*, 1998). Além disso, condições hidrodinâmicas no biorreator, tensão de oxigênio dissolvido, morfologia fúngica e seu crescimento, reologia do meio e a formação e secreção dos produtos interagem durante o bioprocessamento (CUI *et al.*, 1998).

Desta maneira, as características reológicas do meio líquido são afetadas pelo cultivo submerso de fungos filamentosos (FONTANA *et al.*,

2009), devido à mudança na composição do substrato, na concentração de biomassa e na morfologia do micro-organismo (BEROVIC *et al.*, 1993; CHO *et al.*, 2002b). Comportamento não newtoniano é uma característica essencial dos sistemas de cultivo submerso fúngico, no qual ou os filamentos ou a forma de *pellets* do micélio podem predominar. A altas concentrações microbianas, a hifa pode ficar enovelada, resultando em suspensão altamente viscosa com comportamento não-newtoniano. Muitos estudos têm mostrado que o meio de cultivo contendo altas concentrações de micro-organismos filamentosos é altamente viscoso e caracterizado por taxa de cisalhamento dependente da viscosidade e por tensão de escoamento (BEROVIC *et al.*, 1993; CHO *et al.*, 2002; GOUDAR *et al.*, 1999; JU *et al.*, 1991).

Deste modo, o presente estudo tem por objetivo avaliar a influência da velocidade de agitação e do pH na produção de colorantes naturais por cultivo submerso de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 em biorreator mantendo a aeração fixa no sistema de produção.

7.3 Materiais e métodos

7.3.1 Reagentes

Sacarose e extrato de levedura foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brazil) e Acumedia (Lansing, Michigan, USA), respectivamente. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

7.3.2 Micro-organismo

A cepa de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 foi cedida pela Coleção de Culturas DPUA, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, AM, Brasil. Para a manutenção das culturas de *P. purpurogenum*, estas foram mantidas em tubos inclinados contendo meio de cultura Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA), incubados a 25°C, por sete dias, e conservados em geladeira a 4°C, sendo repicados a cada 30 dias.

7.3.3 Meio de cultura

O pré-inóculo foi realizado em placa CYA com a seguinte composição (g/L água deionizada): K_2HPO_4 (1,0), extrato de levedura (5,0), sacarose (30,0), Ágar (15,0) e 10 ml/L de Czapeck concentrado [$NaNO_3$ (30,0 g), KCl (5,0 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5,0 g), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g), água deionizada q.s.p. 100 mL] (PITT, 1985). O meio do inóculo foi CYA líquido (sem a adição de ágar). A composição do meio do cultivo submerso foi similar àquela utilizada no inóculo, exceto pela concentração de sacarose e de extrato de levedura, que foi de 48,50 e 11,80 g/L, respectivamente. Tanto o meio do inóculo quanto o de cultivo tiveram o seu pH ajustado para 4,5, com HCl (5M), e autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

7.3.4 Produção de colorantes naturais por cultivo submerso em biorreator

A etapa de obtenção dos colorantes foi constituída de três fases: pré-inóculo, inóculo e produção. Para a etapa do pré-inóculo, *P. purpurogenum* foi cultivado em placas de Petri contendo meio CYA por 7 dias/30 °C. A partir destas culturas, 5 discos de micélio (8 mm de diâmetro) foram transferidos assepticamente para frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL de meio de cultivo. Este cultivo submerso foi conduzido em agitador orbital a 150 rpm/30°C/ 72 horas e constituiu a fase de inóculo. Ao finalizar o tempo de cultivo, todo o volume obtido (0,2 L) foi transferido assepticamente para um frasco único e, a partir deste, se realizou a transferência do inóculo para o biorreator.

Os experimentos foram realizados em biorreator de 3 L Bioflo® 115 (New Brunswick) contendo 1,8 L de meio de cultivo e 0,2 L de inóculo. Os experimentos foram conduzidos durante 240 horas a 30°C, sendo que, a cada 24 horas, uma alíquota foi retirada. O meio fermentado foi filtrado em papel de filtro Whatman n°1 (Whatman, England) e em membrana Millipore 0,45 µm. A partir do filtrado, determinou-se a produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, pH e consumo de sacarose.

Inicialmente, as condições analisadas foram: velocidade de agitação de 100 a 600 rpm e aeração de 2,0 vvm. A segunda parte do trabalho foi realizada mantendo a aeração em 2,0 vvm, nas velocidades de agitação de 300 e 500 rpm e realizando mudança do pH do meio para 8,0 pela adição de NaOH no

tempo em que houve esgotamento da sacarose no meio, ou seja, após 96 horas de cultivo submerso.

7.3.5 Métodos analíticos

7.3.5.1 Determinação da sacarose, pH e colorantes

A concentração de sacarose foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Dubois *et al.* (1956) e o pH medido em pHmetro.

A produção de colorantes extracelulares foi estimada através da medida da absorbância dos filtrados em aparelho espectrofotômetro, considerando o fator de diluição de cada amostra. O comprimento de onda de cada colorante foi varrido na faixa de 350 a 600 nm. A leitura do sobrenadante atingiu picos a 400, 470 e 490 nm, que corresponde à máxima absorbância para os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, respectivamente. Os resultados foram expressos em termos de Unidades de Absorbância (UA). A máxima absorção obtida para cada colorante está de acordo com os resultados reportados por Johns e Stuart (1991).

7.3.6 Parâmetros calculados

A partir dos dados obtidos, foram determinados o fator de conversão de substrato (sacarose) em produto ($Y_{P/S}$) e produtividade (P) de acordo com as seguintes equações:

$$Y_{P/S} = \frac{Abs_{m\acute{a}x} - Abs_0}{S_0 - S_f} \quad \text{equação 28}$$

$$P = \frac{Abs_{m\acute{a}x}}{t} \quad \text{equação 29}$$

em que: S_0 e S_f são as concentrações inicial e final de substrato (sacarose); $Abs_{m\acute{a}x}$ e Abs_0 são as absorbâncias máxima e inicial dos colorantes; t: tempo (h)

7.4 Resultados e discussão

7.4.1 Produção de colorantes naturais por cultivo submerso em biorreator

Neste trabalho, a produção de colorantes naturais amarelos, laranjas e vermelhos por cultivo submerso de *P. purpurogenum* em biorreator, o qual foi mantido com alta aeração (2,0 vvm), foi avaliada. O principal objetivo foi comparar diferentes velocidades de agitação sobre a capacidade de produção destas biomoléculas em uma mesma condição de aeração. A velocidade de agitação variou entre 100 e 600 rpm. O aumento da velocidade de agitação pode melhorar a transferência de oxigênio; contudo, essa variável é diretamente proporcional à força de cisalhamento e está estritamente relacionada à morfologia do fungo filamentoso (MORITZ, 2005). A Figura 37 apresenta a produção dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos em função do tempo para cada uma das velocidades de agitação avaliadas.

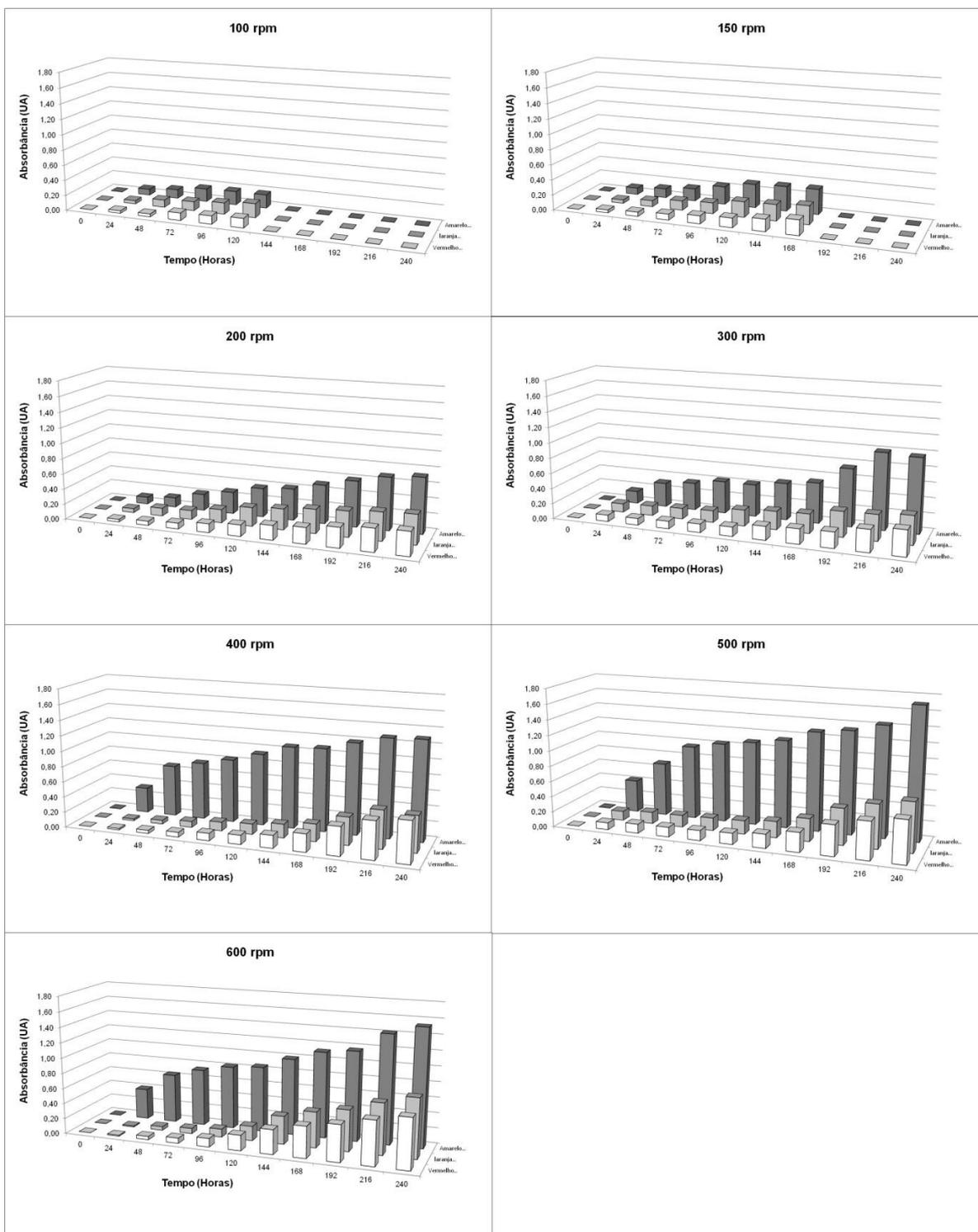


Figura 37. Produção de colorantes amarelos (barras cinza-escuras), laranjas (barras cinza-claras) e vermelhos (barras brancas) por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 em biorreator variando a velocidade de agitação em função do tempo.

Como pode ser observado a partir da Figura 37, a produção dos colorantes foi fortemente influenciada pela velocidade de agitação. Nos menores valores avaliados deste parâmetro, 100 e 150 rpm, o cultivo submerso foi paralisado com 144 e 168 horas de bioprocesso, porque, nestas condições,

o micro-organismo não se distribuiu de forma homogênea no biorreator. Esta é uma das dificuldades em se trabalhar com fungos filamentosos em biorreator, já que o meio disperso de fungos filamentosos, na maior parte das vezes, apresenta viscosidade aparente alta. Além disso, na literatura, é usualmente observado que cultivos submersos de fungos filamentosos apresentam comportamento pseudoplástico, ou seja, não-newtoniano (CHO *et al.*, 2002; GOUDAR *et al.*, 1999; SINHA *et al.*, 2001).

De acordo com Znidarsic *et al.* (2001), meio de cultivo submerso de fungos filamentosos geralmente exibem a diminuição na viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta. O aumento da velocidade de agitação acarreta em aumento na taxa de cisalhamento, promovendo um meio menos heterogêneo (ZNIDARSIC *et al.*, 2001). No caso de fungos filamentosos, devido à alta viscosidade do meio e ao comportamento não-newtoniano do mesmo, é difícil relacionar os resultados com o coeficiente de transferência de oxigênio (k_La), como podem ser encontrados cultivos realizados com outros micro-organismos, como leveduras e bactérias.

Com o aumento da velocidade de agitação, o micro-organismo pareceu estar bem distribuído na dorna e não houve evidência de amontoado do fungo no biorreator, o que possibilitou a determinação dos colorantes naturais produzidos. O principal papel da agitação em biorreatores é melhorar a mistura e a transferência de calor e de massa. Uma favorável mistura dos componentes do meio de cultivo é necessária para minimizar o gradiente de concentração dos nutrientes e assegurar adequada vazão para a superfície da transferência de calor. A mais crítica operação de transferência de massa em cultivo submerso aeróbico é a dissolução de nutrientes requeridos para a respiração dos micro-organismos e em maior extensão a força requerida de agitação. A agitação do meio de cultura pode também ter variedade de efeitos nos micro-organismos. Dentre estes efeitos, podem-se incluir ruptura da parede celular, mudança na morfologia do micro-organismo filamentoso, variação na eficiência de crescimento e taxa de crescimento e variação na taxa de formação do produto desejado (SMITH *et al.*, 1990).

A agitação pode prejudicar tanto os *pellets* miceliais quanto as hifas. A fragmentação de pedaços de hifas a partir de uma superfície pode resultar em hifas fragmentadas, que servem como novos centros para o crescimento da biomassa, ou isto pode causar dano na hifa, acompanhado com liberação do

citoplasma. Por outro lado, a quebra total dos *pellets* pode ocorrer, provavelmente, nos casos de autólise total ou dos agregados (ZNIDARSIC *et al.*, 2001). Desta maneira, velocidades de agitação superiores a 600 rpm não foram avaliadas.

A maior produção de colorantes ocorreu na velocidade de agitação de 500 rpm. Nesta condição, as absorbâncias dos colorantes amarelos, laranjas e vermelhos foram 1,71 UA_{400nm}, 0,71 UA_{470nm} e 0,69 UA_{490nm}, respectivamente, (Figura 40). Comparando estes valores com os melhores obtidos em agitador de bancada, houve redução na produção de duas vezes para os colorantes amarelos e de, aproximadamente, 4 vezes para os colorantes laranjas e amarelos. Este resultado comprova que as melhores condições obtidas em agitador de bancada não são reprodutíveis em biorreator, porque diversas condições mudam no biorreator, principalmente a taxa de transferência de oxigênio no meio.

Diferentemente dos resultados apresentados, Kongruang (2011) estudou a produção de colorantes naturais em biorreator por diferentes isolados de *Monascus purpureus*. Este autor manteve constante tanto a velocidade de agitação (100 rpm) quanto a de aeração ($1,38 \times 10^5$ N/m²). O autor selecionou a velocidade de agitação de 100 rpm, porque, para a cepa estudada, esta agitação gerou alta atividade celular, baixa viscosidade com alta produção de pigmentos.

Todavia, Xu *et al.* (2006), ao estudarem a produção de exopolissacarídeos em cultivo submerso de *Paecilomyces tenuipes*, observaram que a assimilação de açúcares aumenta com o aumento da agitação do sistema. Comportamento similar também foi observado por Lazaridou *et al.* (2002), com *Aureobasidium pullulans*, e Fontana *et al.* (2009), com *Aspergillus oryzae*.

A partir da Figura 41, pode-se observar que o consumo da sacarose apresentou comportamento similar independentemente da velocidade de agitação avaliada. Como citado anteriormente, nas velocidades de agitação de 100 e 150 rpm, houve interrupção do cultivo submerso antes de 240 horas, devido à heterogeneidade na dorna nestas condições. De maneira geral, houve queda da concentração de sacarose durante o cultivo e pode-se observar consumo acentuado da sacarose entre o tempo de 72 e 96 horas. Ao final do

cultivo, a concentração final de sacarose em todos os cultivos se apresentava próxima a 2 g/L.

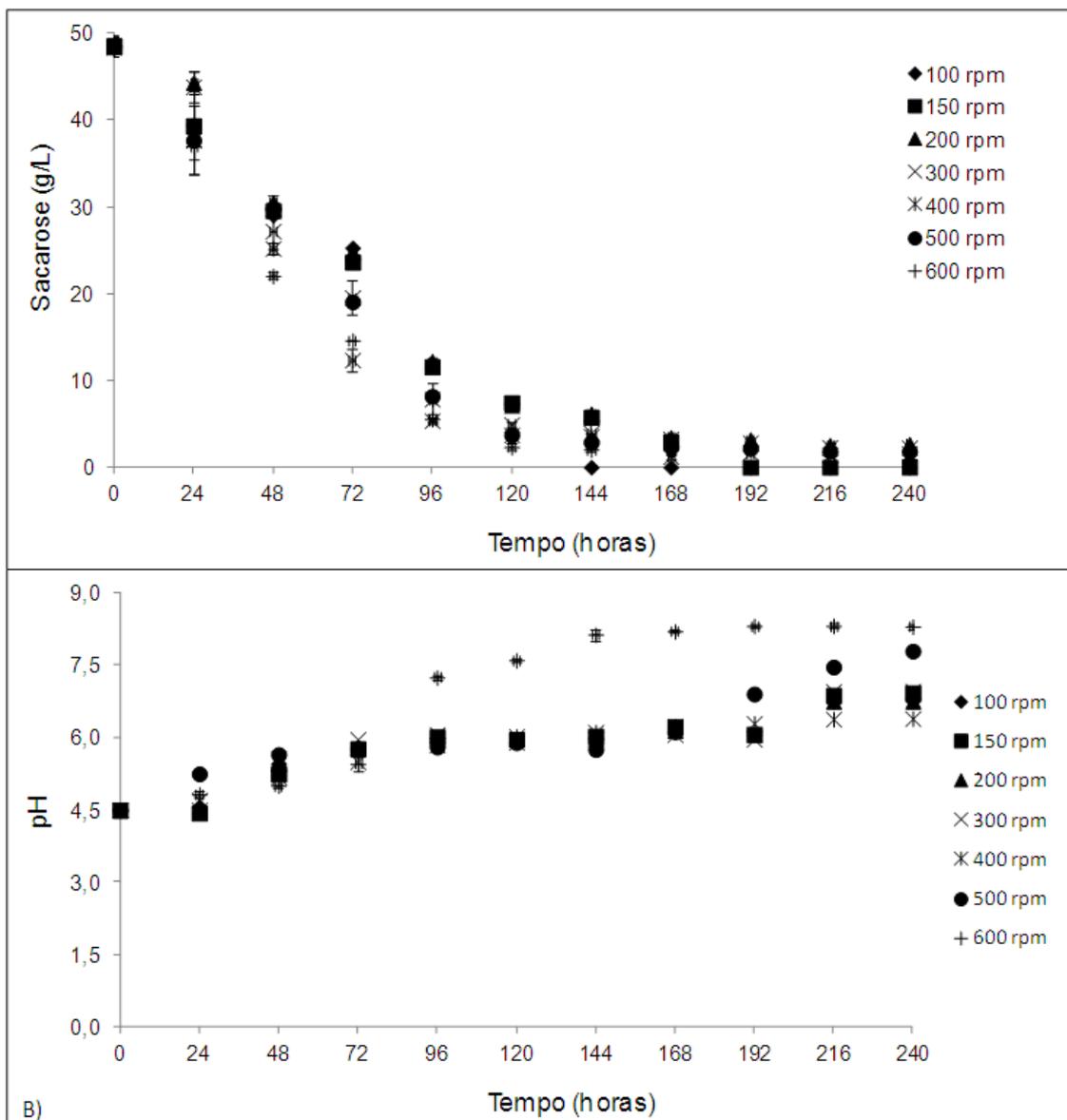


Figura 38. Consumo de sacarose (A) e pH (B) ao longo do tempo do cultivo submerso do *P. purpuregenum* em biorreator variando a velocidade de agitação.

Em relação à variável pH (Figura 38B), independentemente da velocidade de agitação avaliada, houve aumento no seu valor ao longo do cultivo, alcançando valores próximos a 7,5 após 240 horas de bioprocesso. Esse comportamento foi similar ao que ocorreu no cultivo submerso de *P. purpuregenum* DPUA 1275 em incubador de bancada. O pH 4,5 é adequado para proporcionar bom crescimento celular e o micro-organismo produzir os metabólitos primários precursores dos colorantes naturais, com destaque para

os laranjas e os vermelhos, os quais apresentam características de metabólitos secundários.

A Tabela 22 apresenta os resultados dos parâmetros cinéticos Y_p/s e produtividade e da relação entre a produção dos colorantes vermelhos e a produção dos colorantes amarelos (Abs_{CV}/Abs_{CA}) em todas as condições experimentais no tempo de 240 horas.

Tabela 22. Parâmetros cinéticos calculados durante o cultivo submerso de *P. purpurogenum* em biorreator para a produção de colorantes amarelos (CA, UA_{400nm}), colorantes laranjas (CL, UA_{470nm}) e colorantes vermelhos (CV, UA_{490nm}).

Velocidade de agitação (rpm)	Y_p/s (UA.L/g)			Produtividade (UA/h)			Abs_{CV}/Abs_{CA}
	CA	CL	CV	CA	CL	CV	
200	0,016	0,009	0,008	0,003	0,002	0,001	0,411
300	0,021	0,008	0,007	0,004	0,002	0,001	0,485
400	0,028	0,012	0,013	0,005	0,002	0,002	0,461
500	0,037	0,015	0,015	0,007	0,003	0,003	0,405
600	0,032	0,016	0,014	0,006	0,003	0,003	0,425

Abs_{CV}/Abs_{CA} : relação entre a produção dos colorantes vermelhos e colorantes amarelos.

Analisando os resultados, tanto de produtividade quanto de conversão de substrato em produto, os maiores valores foram obtidos na velocidade de agitação de 500 rpm, para todos os colorantes. Este resultado demonstra a importância deste parâmetro em cultivos submersos realizados em biorreator, já que ele está diretamente relacionado à morfologia do micro-organismo, no interior da dorna, e à transferência de massa durante o processo.

Considerando a relação entre a produção dos colorantes vermelhos e a produção dos colorantes amarelos, a velocidade de agitação de 300 rpm promoveu o resultado mais alto. Este parâmetro relaciona a proporção entre a produção de cada um dos referidos colorantes, já que, durante o cultivo submerso de *P. purpurogenum*, há a produção de um complexo contendo os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos. É importante encontrar uma condição experimental que promova não somente alta produção de colorantes, mas, principalmente, dos colorantes vermelhos, pois estes são os mais estudados e também os mais visados industrialmente. Esta abordagem pode ser comprovada pelos inúmeros trabalhos que estudam os colorantes vermelhos (CARVALHO *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2002; CHEN; JOHNS, 1993; CHO *et al.*, 2002a; FABRE *et al.*, 1993; GUNASEKARAN;

POORNIAMMAL, 2008; HAILEI *et al.*, 2011, 2012; KONGRUANG, 2011; MAPARI *et al.*, 2010; MUKHERJEE; SINGH, 2011; MÉNDEZ *et al.*, 2011; PAN *et al.*, 2009).

7.4.1.1 Produção de colorantes naturais por cultivo submerso em biorreator: influência da alteração do pH na fase de produção

Nos experimentos realizados variando a velocidade de agitação, resultados favoráveis foram obtidos ao se trabalhar com 500 (resultados superiores para os parâmetros cinéticos) e 300 rpm (maior relação entre a produção dos colorantes vermelhos e amarelos). Desta maneira, estas agitações foram selecionadas para serem avaliadas em novas condições experimentais. Segundo Orozco e Kilikian (2008), a produção de pigmentos vermelhos por cultivo submerso de *Monascus purpureus* em biorreator pode ser favorecida pela alteração do pH na fase de produção. Estes autores selecionaram pH de 5,5, para a fase de crescimento, e pH 8,0, para a fase de produção. Desta maneira, estratégia similar foi utilizada neste trabalho, de forma a aumentar a produção de colorantes naturais por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 em biorreator.

Assim, de acordo com os resultados obtidos na fase de otimização em agitador de bancada, utilizou-se pH 4,5 no início do cultivo submerso e, após 96 horas, houve alteração do pH para 8,0, pela adição de NaOH 5M. O pH 8,0 foi selecionado de acordo com os resultados reportados por Orozco e Kilikian (2008) e devido à superior estabilidade dos colorantes vermelhos nesta condição, como obtido em resultados prévios. O tempo de 96 horas foi selecionado de acordo com os experimentos realizados variando a velocidade de agitação, pois se observou que, neste tempo, houve a acentuada queda na concentração da fonte primária de carbono (sacarose). Como o crescimento celular não foi acompanhado ao longo do bioprocessamento, não é possível dizer em qual fase de crescimento o micro-organismo estava neste tempo.

A Figura 39 e a Figura 40 apresentam a produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos e o pH para os ensaios realizados a 300 e 500 rpm, respectivamente.

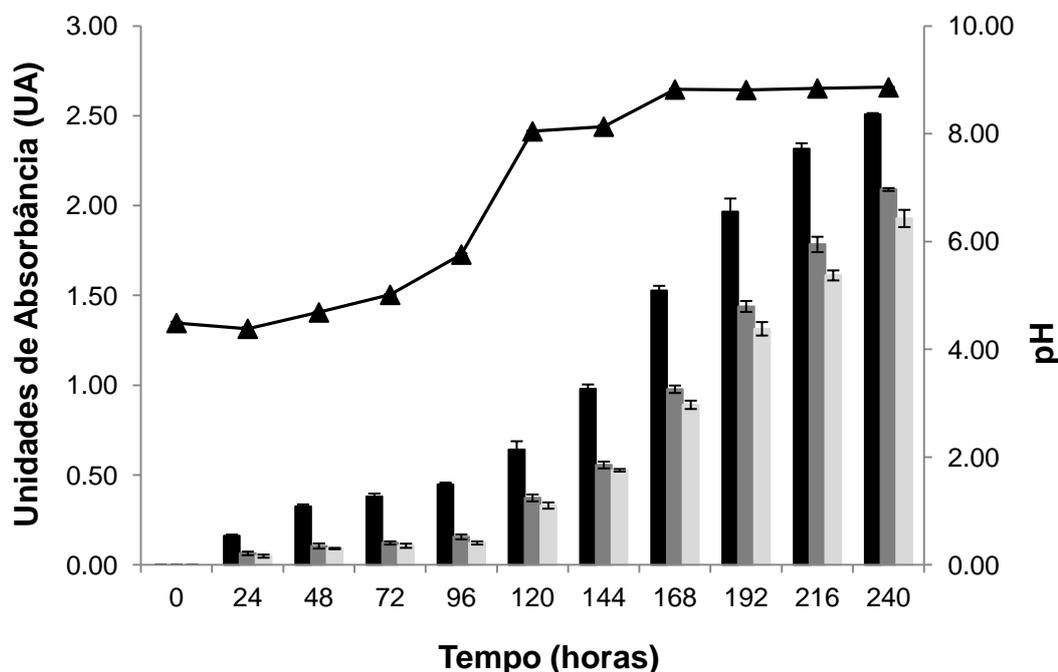


Figura 39. Produção de colorantes amarelos (barras pretas), laranjas (barras cinza-escuras) e vermelhos (barras cinza-claras), e variação do pH (▲) em função do tempo durante cultivo submerso do *P. purpurogenum* DPUA 1275 em biorreator na velocidade de agitação de 300 rpm. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Comparando os resultados obtidos nos experimentos sem a alteração do pH com aqueles obtidos com a alteração de pH para 8,0 no tempo de 96 horas, é possível observar o significativo incremento na produção de todos os colorantes, sendo este aumento mais significativo para os colorantes laranjas e vermelhos, ambos próximos a 400%. Além disso, é evidente a influência que a alteração no pH do meio de cultivo teve sobre a produção e/ou a extração dos colorantes. O pH 8,0 pode proporcionar maior liberação dos colorantes presentes na célula – já que, neste trabalho, apesar de estarmos buscando os colorantes extracelulares, sabemos que também temos os colorantes intracelulares, que permanecem na célula, mesmo após a filtração, e que podem ser melhor difundidos para o meio fermentado, caso trabalhemos com condições mais básicas.

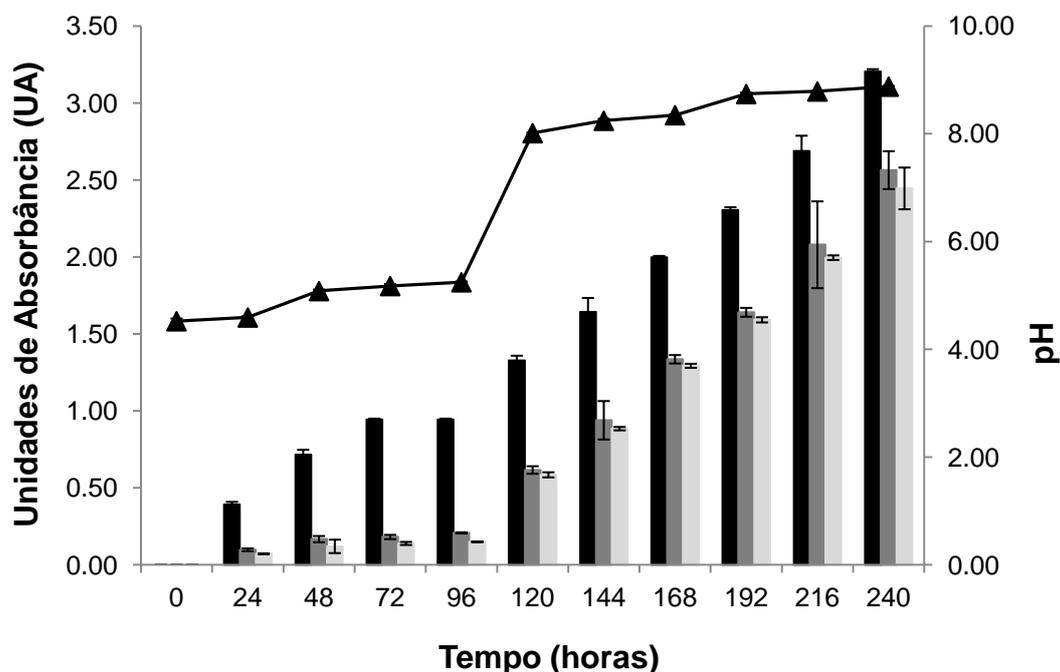


Figura 40. Produção de colorantes amarelos (barras pretas), laranjas (barras cinza escuro) e vermelhos (barras cinza claro), e variação do pH (▲) em função do tempo durante cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 em biorreator numa velocidade de agitação de 500 rpm. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Para a velocidade de agitação de 500 rpm, a alteração do pH para 8,0 com 96 horas também gerou significativo aumento na produção dos colorantes. Neste caso, comparando os resultados obtidos na condição sem alteração do pH no tempo de 96 horas com os obtidos alterando o pH, houve incremento na produção de todos os colorantes, porém, este aumento de absorbância proporcionalmente foi inferior ao observado com a velocidade de agitação de 300 rpm. De qualquer forma, nesta condição, para os colorantes amarelos, o aumento da absorbância foi em torno de 87%, enquanto que, para os colorantes laranjas e vermelhos, houve aumento na absorbância próximo a 250%. Os valores de absorbância observados para os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos foram 3,20 UA_{400nm}, 2,56 UA_{470nm} e 2,45 UA_{490nm}, respectivamente. Estes valores, apesar de superiores aos obtidos nas primeiras fermentações em biorreator, ainda são inferiores aos obtidos na melhor condição em frascos agitados, o que demonstra que novas condições podem incrementar mais a produção de colorantes naturais por *P. purpurogenum* DPUA 1275. A Tabela 23 apresenta os parâmetros cinéticos.

Tabela 23. Parâmetros cinéticos calculados durante o cultivo submerso de *P. purpurogenum* em biorreator para a produção de colorantes amarelos (CA, UA_{400nm}), colorantes laranjas (CL, UA_{470nm}) e colorantes vermelhos (CV, UA_{490nm}).

Velocidade de agitação	Y _p /s (UA.L/g)			Produtividade (UA/h)			Abs _{CV} /Abs _{CA}
	CA	CL	CV	CA	CL	CV	
300	0,053	0,044	0,041	0,010	0,009	0,008	0,769
500	0,067	0,054	0,052	0,013	0,011	0,010	0,766

Abs_{CV}/Abs_{CA}: relação entre a produção dos colorantes vermelhos e a produção dos colorantes amarelos.

Todos os parâmetros cinéticos avaliados foram melhorados com a variação do pH para 8,0 após o tempo de 96 horas. A taxa de conversão de substrato em produto para os experimentos a 500 rpm aumentou de 0,037 para 0,067, para os colorantes amarelos, e de 0,015 para 0,054 e 0,052, para os colorantes laranjas e vermelhos, respectivamente. Da mesma maneira, a produtividade de todos os colorantes aumentou nesta segunda condição experimental.

É possível observar, a partir dos experimentos descritos acima, que o pH de cultivo é fundamental para a ativação de enzimas que participam do metabolismo secundário em fungos filamentosos.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Orozco e Kilikian (2008), os quais citam que diferentes níveis de pH durante a fase de crescimento e a fase de produção podem acarretar em incremento na produção de colorantes por fungos filamentosos. Outros trabalhos encontrados na literatura citam a importância da variável pH durante o cultivo submerso de fungos filamentosos (CHEN; JOHNS, 1993; MÉNDEZ *et al.*, 2011). Estes autores também reportaram que, em condições básicas, há melhor excreção dos bioprodutos por fungos filamentosos.

Ademais, segundo Slugen e Rosenberg (2002), citados por Moritz (2005), em pH ácidos ocorre inibição da produção de pigmentos vermelhos e uma das hipóteses é que a liberação dos pigmentos intracelulares só se dê em valores de pH alcalinos, favorecendo o aumento da permeabilidade celular ou mesmo a lise celular. O mesmo já não acontece para o crescimento celular, pois o pH alcalino desfavorece o crescimento fúngico.

A Figura 41 apresenta amostras filtradas em filtro Millipore 0,45 µm, produzidas ao longo do tempo, para os experimentos de velocidade de agitação a 500 rpm.



Figura 41. Produção de colorantes ao longo do tempo no cultivo submerso do *P. purpurogenum* em biorreator na velocidade de agitação de 500 rpm.

Através da Figura 40 observa-se uma diferença perceptível na tonalidade das amostras retiradas ao longo do cultivo submerso de *P. purpurogenum* em biorreator. Desta maneira, em conclusão, pode-se dizer que colorantes naturais podem ser obtidos por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275 em biorreator, porém as condições do cultivo podem ser otimizadas e a produção incrementada variando, principalmente, o pH durante o bioprocessamento.

7.5 Conclusão

Este trabalho avaliou a influência da velocidade de agitação e do pH na produção de colorantes naturais por *P. purpurogenum* em biorreator agitado. As maiores produções dos colorantes ocorreram a 500 rpm, com uma mudança do pH do meio para 8,0 durante a fase de produção. Estes resultados demonstram que o pH exerce grande influência sobre a produção dos colorantes e que, apesar das dificuldades em termos de viscosidade do meio, durante o cultivo submerso de fungos filamentosos em biorreator, há a possibilidade de se utilizar esta estratégia ao se trabalhar com condições adequadas, principalmente de agitação e pH.

8. CAPÍTULO VIII

8.1 Considerações finais

Considerando os resultados obtidos nesta tese, de acordo com as condições experimentais, conclui-se que:

Na etapa de seleção da metodologia de inoculação e das fontes de carbono e nitrogênio mais adequadas para a produção dos colorantes naturais em incubador rotativo, os melhores resultados foram obtidos com 5 discos de micélio, sacarose (fonte de carbono) e extrato de levedura (fonte de nitrogênio) no tempo de 336 horas. Estas condições foram selecionadas para o estudo das melhores condições por planejamento fatorial.

Os resultados obtidos a partir dos planejamentos fatoriais, que analisaram as variáveis independentes: tempo de fermentação, velocidade de agitação, pH, temperatura e concentração de sacarose e extrato de levedura sobre a produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, sugerem que as concentrações de sacarose e de extrato de levedura são as variáveis mais importantes no processo de obtenção de colorantes naturais por cultivo submerso de *P. purpurogenum* DPUA 1275, sendo que as concentrações ideais destes substratos seriam valores próximos a 50 g/L e 12 g/L, respectivamente.

No estudo de otimização da produção dos colorantes vermelhos em incubador rotativo, as melhores condições foram sacarose (48,90 g/L) e extrato de levedura (11,90 g/L).

Os estudos de estabilidade indicaram que os colorantes presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum* são mais estáveis em níveis de pH básicos, em especial em pH 8,0. Além disso, estes metabólitos permaneceram estáveis até 70°C e não sofreram alteração de coloração na presença dos sais NaCl e Na₂SO₄, independentemente da concentração utilizada. Na presença de 5 e 15% dos polímeros PEG 1.000, 6.000 e 10.000 g/mol e NaPA 8.000 g/mol, os colorantes também não acarretaram em mudanças na estabilidade destas biomoléculas.

Para o estudo da construção das curvas binodais, para os sistemas formados por PEG 1.000, 6.000 e 10.000 g/mol e NaPA 8.000 g/mol, na presença de NaCl e Na₂SO₄, em diferentes concentrações, observou-se que para todas as massas molares de PEG estudadas, o aumento da concentração, tanto do NaCl quanto do Na₂SO₄, deslocou a curva binodal, causando diferença nas curvas em concentrações diferentes de um mesmo sal. A maior ação no sistema deslocando a curva binodal para maior região de duas fases aquosas foi o Na₂SO₄ a 0,5M.

Para os estudos de extração dos colorantes vermelhos pelo Sistema Polimérico de Duas Fases Aquosas (SPDFA) com polietileno glicol (PEG) e poliacrilato de sódio (NaPA), os colorantes migraram preferencialmente para a fase PEG e obtiveram-se coeficientes de partição maiores do que 10. Os melhores resultados foram encontrados com PEG 6.000 g/mol/NaCl e PEG 10.000 g/mol/Na₂SO₄ 0,5M. Desta forma, este método de extração pode ser considerado eficiente para extração dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum*.

Os colorantes vermelhos foram avaliados em termos de solubilidade em diferentes solventes orgânicos e coeficiente de partição octanol-água, os quais mostraram que os colorantes vermelhos têm características mais hidrofílicas do que hidrofóbicas. Ademais, os colorantes vermelhos apresentaram boa estabilidade frente aos tensoativos SDS, CTAB e Tween 20.

Nos estudos de partição dos colorantes vermelhos pela técnica de *Colloidal Gas Aphrons* (CGA), as maiores recuperações foram alcançadas com CGA geradas por surfactantes não iônico (Tween 20) e catiônico (CTAB). Estes resultados indicam que os colorantes vermelhos são negativamente carregados e sua separação por CGA é dirigida tanto por interações eletrostáticas quanto hidrofóbicas. Desta maneira, a técnica de CGA se mostrou adequada como primeira etapa de partição dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado de *P. purpurogenum*.

Nos estudos de produção dos colorantes naturais por cultivo submerso em biorreator, tanto a velocidade de agitação quanto o pH se mostraram como

variáveis importantes a serem analisadas. Os melhores resultados foram obtidos ao se trabalhar com velocidade de agitação de 500 rpm e mudança do pH para 8,0 no tempo de 96 horas.

O *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275 mostrou ser um produtor alternativo de colorantes naturais, os quais apresentam características interessantes para aplicação em diversos segmentos industriais, como alimentício, cosmético, farmacêutico, de embalagens, entre outros. As técnicas de extração líquido-líquido avaliadas apresentaram resultados adequados, evidenciando o potencial destas técnicas para extração de outras biomoléculas presentes em meios fermentados. Como se tratou de um estudo pioneiro e inovador sobre a produção e extração de colorantes naturais produzidos por *Penicillium purpurogenum*, existem diversas questões relacionadas à toxicologia e elucidação da estrutura química dos colorantes produzidos a serem analisados. Estudos referentes à estrutura química dos colorantes estão em desenvolvimento no nosso laboratório. Todavia, há um amplo campo de pesquisa a ser explorado sobre a toxicidade e a aplicação destes colorantes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P.A. Partition of cell particles and macromolecules: separation and purification of biomolecules, cell, organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 1986. 346p. (Science, Technology & Business, 91).

ALVES, R.W.; SOUZA, A.A.U.; ARRUDA GUELLI ULSON DE SOUZA, S.M.; JAUREGI, P. Recovery of norbixin from a raw extraction solution of annatto pigments using colloidal gas aphanes (CGAs). Separation and Purification Technology, v.48, n.2, p.208-213, 2006.

AMIRI, M.C.; WOODBURN, E.T. A method for the characterization of colloidal gas aphanes. Transactions of the Institution of Chemical Engineers, n.68, p.154–160, 1990.

ANTUNES, J.G. Bioconversão de D-xilose a etanol por *Pichia stipitis*. Rio de Janeiro, 1997. Dissertação de Mestrado - Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BABITHA, S.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. Bioresource Technology, v.98, n.8, p.1554-1560, 2007.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. Biochemical engineering: fundamentals. 2.ed. New York: McGraw Hill, 1986. 984p. (McGraw-Hill chemical engineering series).

BELANCIC, A.; SCARPA, J.; PEIRANO, A.; DÍAZ, R.; STEINER, J.; EYZAGUIRRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. Journal of Biotechnology, v.41, n.1, p.71-79, 1995.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from

Porphyridium cruentum. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.807, n.1, p.33-38, 2004.

BEROVIC, M.; CIMERMAN, A.; STEINER, W.; KOLOINI, T. Submerged citric acid fermentation: rheological properties of *Aspergillus niger* broth in a stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.34, p.579–581, 1991.

BEROVIC, M.; KOLOINI, T.; OLSVIK, E.S.; KRISTIANSEN, B. Rheological and morphological properties of submerged citric acid fermentation broth in stirred-tank and bubble column reactors. *Chemical Engineering Journal*, v.53, p.B35–B40, 1993.

BHAT, K.L.; GARG, A.; BOCK, C.W. Calculated values of the octanol – water partition coefficient and aqueous solubility for aminoazobenzene dyes and related structures. *Dyes and Pigments*, v.52, p.145-159, 2002.

BOO, H.-O.; HWANG, S.-J.; BAE, C.-S.; PARK, S.-H.; HEO, B.-G.; GORINSTEIN, S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products*, v.40, p.129-135, 2012.

BORGES, M.E.; TEJERA, R.L.; DÍAZ, L.; ESPARZA, P.; IBÁÑEZ, E. Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. *Food Chemistry*, v.132, n.4, p.1855-1860, 2012.

BOX, G.E.P.; WILSON, K.B. On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological)*, v.13, n.1, p.1–45, 1951.

BRITTON, G. Pigments in food: more than just colour. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PIGMENTS IN FOOD TECHNOLOGY, 1, Sevilla, 1999. Proceedings. Sevilla, 1999. pag 3-9.

BRUNS, R.E.; SCARMINIO, B.B.N. Statistical design: chemometrics. Amsterdam: Elsevier, 2006. 412p. (Data handling in science and technology, 25).

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

CARVALHO, J.C.; OISHI, B.O.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.48, n.6, p.885-894, 2005.

CAVALCANTI, M.T.H.; PORTO, T.S.; BARROS NETO, B.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A.L.; PESSOA Jr., A. Aqueous two-phase systems extraction of alpha-toxin from *Clostridium perfringens* type A. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.833, n.2, p.135-140, 2006.

CAVALCANTI, M.T.H.; CARNEIRO DA CUNHA, M.G.; BRANDI, I.V. PORTO, T.S.; CONVERTIC, A.; LIMA FILHOA, J.L.; PORTO, A.L.F.; PESSOA Jr., A. Continuous extraction of α -toxin from a fermented broth of *Clostridium perfringens* type A in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase PEG-phosphate system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v.47, n.9/10, p.1771-1776, 2008.

CELIK, E.; CALIK, P. Bioprocess parameters and oxygen transfer characteristics in beta-lactamase production by *Bacillus* species. *Biotechnology Progress*, v.20, p.491-499, 2004.

CHANG, Y.-N.; HUANG, J.-C.; LEE, C.-C.; SHIH, I.-L.; TZENG, Y.-M. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.30, n.7, p.889-894, 2002.

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

CHEN, M.H.; JOHNS, M.R. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.40, p.132-138, 1993.

CHEN, Q.H.; HE, G.Q.; MOKHTAR, A.M.A. Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp., EL31419 with response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, v.30, p.667-672, 2002.

CHETHANA, S.; NAYAK, C.A.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *Journal of Food Engineering*, v.81, n.4, p.679-687, 2007.

CHEVALIER, Y.; ZEMB, T. The structure of micelles and microemulsions. *Reports on Progress in Physics*, v.53, p.279-371, 1990.

CHO, Y.J.; PARK, J.P.; HWANG, H.J.; KIM, S.W.; CHOI, J.W.; YUN, J.W. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*, v.35, n.3, p.195-202, 2002a.

CHO, Y.J.; HWANG, H.J.; KIM, S.W.; SONG, C.H.; YUN, J.W. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *Journal of Biotechnology*, v.95, n.1, p.13-23, 2002b.

CISNEROS, M.; BENAVIDES, J.; BRENES, H.C.; RITO-PALOMARES, M. Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoides*. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.807, n.1, p.105-110, 2004.

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

CRAFT, N.E.; SOARES Jr., J.H. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, n.3, p.431-434, 1992.

CUI, Y.Q.; VAN DER LANS, R.G.; LUYBEN, K.C. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.57, n.4, p.409-419, 1998.

DAÍ, Y.; DENG, T. Stabilization and characterization of colloidal gas aphon dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.261, n.2, p.360-365, 2003.

DEMIATE, I.M.; WOSIAZKI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. *Exact and Soil Sciences, Agrarian S. and Engineering*, v.8, p.65-78, 2002.

DERMIKI, M.; BOURQUIN, A.L.; JAUREGI, P. Separation of astaxanthin from cells of *Phaffia rhodozyma* using colloidal gas aphon in a flotation column. *Biotechnology Progress*, v.26, n.2, p.477-87, 2010.

DERMIKI, M.; GORDON, M.H.; JAUREGI, P. The use of colloidal gas aphon as novel downstream processing for the recovery of astaxanthin from cells of *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.83, n.2, p.174-182, 2008.

DERMIKI, M.; GORDON, M.H.; JAUREGI, P. Recovery of astaxanthin using colloidal gas aphon (CGA): a mechanistic study. *Separation and Purification Technology*, v.65, n.1, p.54-64, 2009.

DEVEOGLU, O.; CAKMAKCI, E.; TASKOPRU, T.; TORGAN, E.; KARADAG, R. Identification by RP-HPLC-DAD, FTIR, TGA and FESEM-EDAX of natural pigments prepared from *Datisca cannabina* L. *Dyes and Pigments*, v.94, n.3, p.437-442, 2012.

DHAKE, A.B.; PATIL, M.B. Production of β -glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, n.2, p.170-176, 2005.

DRIVAS, I.; BLACKBURN, R.S.; RAYNER, C.M. Natural anthraquinonoid colorants as platform chemicals in the synthesis of sustainable disperse dyes for polyesters. *Dyes and Pigments*, v.88, n.1, p.7-17, 2011.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

DUFOSSÉ, L. Microbial production of food grade pigments. *Food Technology and Biotechnology*, v.44, n.3, p.313-321, 2006.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S.M.; BLANC, P.; MURTHY, K.N.C.; RAVISHANKAR, G.A. 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. (3rd. International Congress on Pigments in Food).

DURAN, N.; TEIXEIRA, M.F.S.; CONTI, R.; ESPOSITO, E. Ecological-friendly pigments from fungi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.42, n.1, p.53-66, 2002.

DZIEZAK, J.D. Applications of food colorants. *Food Technology*, v.41, p.78-80, 1987.

EGAÑA, L.; GUTIÉRREZ, R.; CAPUTO, V.; PEIRANO, A.; STEINER, J.; EYZAGUIRRE, J. Purification and characterization of two acetyl xylan esterases from *Penicillium purpurogenum*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.24, pt.1, p.33-39, 1996.

EL-ENSHASY, H.A. Filamentous fungal cultures – process characteristics, products, and applications. In: YANG, S.-T., eds. *Bioprocessing for value-added*

products from renewable resources: new technologies and applications. Amsterdam: Elsevier, 2007. cap.9, p.225-261.

ES-SAFI, N.-E. Colour of a xanthylium pigment in aqueous solutions at different pH values. *Food Chemistry*, v.88, n.3, p.367-372, 2004.

ESMANHOTO, E.; KILIKIAN, B.V. ATPS applied to extraction of small molecules - polycetides - and simultaneous clarification of culture media with filamentous microorganisms. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.807, n.1, p.139-143, 2004.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. 510p. (Coleção biotecnologia).

FABRE, E.C.; SANTERRE, A.L.; LORET, M.O.; BABERIAN, R.; PAREILLEUX, A.; GOMA, G.; BLANC, P.J. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. *Journal of Food Science*, v.58, n.5, p.1099-1110, 1993.

FANG, T.J.; CHENG, Y.S. Improvement of Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.75, p.466-469, 1993.

FONTANA, R.C.; POLIDORO, T.A.; SILVEIRA, M.M. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*, v.100, n.19, p.4493-8, 2009.

FRITZ, M.; RAVANAL, M.C.; BRAET, C.; EYZAGUIRRE, J. A family 51 alpha-l-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: purification, properties and amino acid sequence. *Mycological Research*, v.112, pt.8, p.933-942, 2008.

FUDA, E.; JAUREGI, P. An insight into the mechanism of protein separation by colloidal gas aphrons (CGA) generated from ionic surfactants. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.843, n.2, p.317-326, 2006.

FUDA, E.; BHATIA, D.; PYLE, D.L.; JAUREGI, P. Selective separation of beta-lactoglobulin from sweet whey using CGAs generated from the cationic surfactant CTAB. *Biotechnology and Bioengineering*, v.90, n.5, p.532-542, 2005.

FUDA, E.; JAUREGI, P.; PYLE, D.L. Recovery of lactoferrin and lactoperoxidase from sweet whey using colloidal gas aphrons (CGAs) generated from an anionic surfactant, AOT. *Biotechnology Progress*, v.20, n.2, p.514-525, 2004.

GABELMAN, J., ed. *Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients*. New York, Chichester: John Wiley, 1994. 361p.

GAMS, W., AA, H.A., eds. *CBS course of mycology*. Baarn: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 1975. 104p.

GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D. CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, v.42, n.5/6, p.577-587, 2009.

GOKTURK, S. Effect of hydrophobicity on micellar binding of carminic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, v.169, p.115-121, 2005.

GOMPERTZ, O.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CORRÊA, B. *Biologia dos fungos*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F., eds. *Microbiologia*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

GONÇALVES, D.B.; TEIXEIRA, J.A.; BAZZOLLI, D.M.S.; QUEIROZ, M.V.; ARAÚJO, E.F. Use of response surface methodology to optimize production of pectinases by recombinant *Penicillium griseoroseum* T20. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.1, n.2, p.140-146, 2012.

GORDON, D.B. Mass spectrometric techniques. In: WILSON, K.; WALKER, J.M., eds. Principles and techniques of practical biochemistry. 4.ed. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1995.

GOUDAR, C.T.; STREVETT, K.A.; SHAH, S.N. Influence of microbial concentration on the rheology of non-Newtonian fermentation broths. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.51, p.310–315, 1999.

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

GRIFFIN, D.H. Fungal physiology. 2.ed. New York: Wiley Liss, 1994. 458p.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, p.454-500, 1999.

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

GUO, J.; ZHUANG, Y.; CHEN, L.; LIU, J.; LI, D.; YE, N. Process optimization for microwave-assisted direct liquefaction of *Sargassum polycystum* C. Agardh using response surface methodology. *Bioresource Technology*, v.120, p.19-25, 2012.

GUPTA, V.; NATH, S.; CHAND, S. Role of water structure on phase separation in polyelectrolyte-polyethyleneglycol based aqueous two-phase systems. *Polymer*, v.43, n.11, p.3387-3390, 2002.

GÖSUNGUR, Y.; UZUNOĞULLARÍ, P.; DAĞBAĞLÍ, S. Optimization of pullulan production from hydrolysed potato starch waste by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, v.83, p.1330–1337, 2011.

HAILEI, W.; PING, L.; YUFENG, L.; ZHIFANG, R.; GANG, W. Overproduction of a potential red pigment by a specific self-immobilization biomembrane-surface liquid culture of *Penicillium novae-zeelandiae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.35, n.8, p.1407-1416, 2012.

HAILEI, W.; ZHIFANG, R.; PING, L.; YANCHANG, G.; GUOSHENG, L.; JIANMING, Y. Improvement of the production of a red pigment in *Penicillium* sp. HSD07B synthesized during co-culture with *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*, v.102, n.10, p.6082-6087, 2011.

HASHIM, M.A.; KUMAR, S.V.; SENGUPTA, B. Particle-bubble attachment in yeast flotation by colloidal gas aphanes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.22, p.333-336, 2000.

HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems: methods and protocols: methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2000. 440p. (Methods in biotechnology, 11).

HERBST, W.; HUNGER, K. Industrial organic pigments: production, properties, applications. 2.ed. Weinheim: VCH, 1997. 652p.

HIDALGO, M.; STEINER, J.; EYZAGUIRRE, J. β -Glucosidase from *Penicillium purpurogenum*: purification and properties. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.15, p.185-191, 1992.

ISRAELACHVILI, J.N. Intermolecular and surface forces. 2.ed. London: Academic Press, 1991. 540p.

JARUDILOKKUL, S.; RUNGPHETCHARAT, K.; BOONAMNUAYVITAYA, V. Protein separation by colloidal gas aphanes using nonionic surfactant. *Separation and Purification Technology*, v.35, n.1, p.23-29, 2004.

JAUREGI, P.; VARLEY, J. Colloidal gas aphanes: potential applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v.17, n.10, p.389-395, 1999.

JAUREGI, P.; DERMIKI, M. Separation of value-added bioproducts by colloidal gas aphyrons (CGA) flotation and applications in the recovery of value-added food products. In: RIZVI, S.S.H., ed. Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries. Ithaca: Woodhead Publishing, 2010. p.284-313. (Woodhead Publishing Series in Food Science, n.202).

JAUREGI, P.; MITCHELL, G.R.; VARLEY, J. Colloidal gas aphyrons (cga): dispersion and structural features. *AIChE Journal*, v.46, n.1, p.24–36, 2000.

JAUREGI, P.; GILMOUR, S.; VARLEY, J. Characterisation of colloidal gas aphyrons for subsequent use for protein recovery. *Chemical Engineering Journal*, v.65, n.1, p.1-11, 1997.

JESPERSEN, L.; STROMDAHL, L.D.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L.H. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, v.220, p.261-266, 2005.

JIANG, C.; WANG, M.; LIU, J.; GAN, D.; ZENG, X. Extraction, preliminary characterization, antioxidant and anticancer activities in vitro of polysaccharides from *Cyclina sinensis*. *Carbohydrate Polymers*, v.84, n.3, p.851-857, 2011.

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

JOHANSSON, G. Affinity partitioning of proteins using aqueous two-phase systems. In: JANSON, J.-C.; RYDÉN, L., eds. *Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications*. 2.ed. New York: Jan-Christer Janson & Lars Rydén, Wiley-VCH, 1998.

JOHANSSON, H.-O.; ISHII, M.; MINAGUTI, M.; FEITOSA, E.; VESSONI PENNA, T.C.; PESSOA Jr., A. Separation and partitioning of green fluorescent protein from *Escherichia coli* homogenate in poly(ethylene glycol)/sodium-

poly(acrylate) aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, v.62, n.1, p.166-174, 2008a.

JOHANSSON, H.-O.; MAGALDI, F.M.; FEITOSA, E.; PESSOA, A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography, A*, v.1178, n.1/2, p.145-153, 2008b.

JOHNS, M.R.; STUART, D.M. Production of pigments by *monascus-purpureus* in solid culture. *Journal of Industrial Microbiology*, v.8, n.1, p.23-28, 1991.

JU, L.; HO, C.S.; SHANAHAN, J.F. Effects of carbon dioxide on the rheological behavior and oxygen transfer in submerged penicillin fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, v.38, p.1223–1232, 1991.

KANG, S.G.; RHIM, J.W.; JUNG, S.T.; KIM, S.J. Production of red and yellow pigment from *Monascus anka* in a jar fermenter. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v.24, p.756-762, 1996.

KIM, J.K.; PARK, S.M.; LEE, S.J. Novel antimutagenic pigment produced by *Bacillus icheniformis* SSA3. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.5, p.48-50, 1995.

KLIMPEL, R. Instructional module on introduction to solid–solid separation of fine particles by froth flotation. Gainesville: NSF Engineering Research Center for Particle Science and Technology, 1998. (Instructional modules on particle science & technology; Instructional module series). 40p.

KONGRUANG, S. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.38, n.1, p.93-99, 2011.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARINS, J.E.C.; HEINS-VACARRI, E.M.; MELLO, N.K. *Tratado de micologia médica* Lacaz. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LAURO, G.J. A primer on natural colors. *Cereal Foods World*, v.36, p.949-953, 1991.

LAZARIDOU, A.; ROUKAS, T.; BILIADERIS, C.; VAIKOUSI, H. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, n.1/2, p.122-132, 2002.

LEE, B.C.; BAE, J.T.; PYO, H.B.; CHOE, T.B.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; YUN, J.W. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.35, n.5, p.369-376, 2004.

LEHNINGER, A.L. *Bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. 262p. [v.1. Componentes moleculares das células].

LIAN, X.; WANG, C.; GUO, K. Identification of new red pigments produced by *Monascus ruber*. *Dyes and Pigments*, v.73, n.1, p.121-125, 2007.

LIMA, C.A.; RODRIGUES, P.M.B.; PORTO, T.S.; VIANA, D.A.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; CUNHA, M.G.C. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM3622. *Biochemical Engineering Journal*, v.43, n.3, p.315-320, 2009.

LOPES, A.M. Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade. São Paulo, 2006. Dissertação de Mestrado – Faculdade de ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MAGESTE, A.B.; LEMOS, L.R.; FERREIRA, G.M.D.; SILVA, M.C.; SILVA, L.H.; BONOMO, R.C.; MINIM, L.A. Aqueous two-phase systems: an efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. *Journal of Chromatography, A*, v.1216, n.45, p.7623-7629, 2009.

MALDONADO, M.C.; SAAD, A.M.S.; CALLIERI, D. Catabolic repression of the synthesis of inducible polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus Níger*. *Current Microbiology*, v.18, p.303-306, 1989.

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

MANIASSO, N. Micellar media in analytical chemistry. *Química Nova*, v.24, n.1, p.87-93, 2001.

MANSUR, E.H.A.; WANG, Y.; DAI, Y. Removal of suspensions of fine particles from water by colloidal gas aphrons (CGAs). *Separation and Purification Technology*, v.48, n.1, p.71-77, 2006.

MAPARI, S.A.S.; HANSEN, M.E.; MEYER, A.S.; THRANE, U. Computerized screening for novel producers of Monascus-like food pigments in *Penicillium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n.21, p.9981-9989, 2008.

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

MAPARI, S.A.S.; MEYER, A.S.; THRANE, U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.14, p.6253-61, 2009.

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

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

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

MARAN, J.P.; MANIKANDAN, S. Response surface modeling and optimization of process parameters for aqueous extraction of pigments from prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit. *Dyes and Pigments*, v.95, n.3, p.465-472, 2012.

MARCO, H.G.; GÄDE, G. Biological activity of the predicted red pigment-concentrating hormone of *Daphnia pulex* in a crustacean and an insect. *General and Comparative Endocrinology*, v.166, n.1, p.104-110, 2010.

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

MASAHIRO, K.O.; MINE, K.; TAYA, M.; TONE, S.; ICHI, T. Production and release of anthraquinone pigments by hairy roots of madder (*Rubia tinctorum* L.) under improved culture conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.77, n.103-106, 1994.

MATSUSHITA, K.; MOLLAH, A.H.; STUCKEY, D.C.; CERRO, C.; BAILEY, A.I. Predispersed solvent extraction of dilute products using colloidal gas aphanes and colloidal liquid aphanes: aphan separation, stability and size. *Colloids and Surfaces*, v.69, n.1, p.65–72, 1992.

MAYERHOFF, Z.D.V.L.; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering Journal*, v.18, p.217-223, 2004.

MEINICKE, R.M. Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso. Florianópolis, 2008. 117p. Dissertação de Mestrado – Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina.

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

MIRANDA, M.S.; CINTRA, R.G.; BARROS, S.B.M.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity of the microalgae *Spirulina máxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.31, p.1075-1079, 1998.

MITSCHEKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedade e aplicações. *Química Nova*, v.25, p.772-776, 2002.

MORITZ, D.E. Produção do pigmento monascus por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso. Florianópolis, 2005. 134p. Tese de Doutorado – Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina.

MUKHERJEE, G.; SINGH, S.K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v.46, n.1, p.188-192, 2011.

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

NGUYEN, A.V.; SCHULZE, H.J. Colloidal aspects of flotation. In: NGUYEN, A.; SCHULZE, H., eds. *Colloidal science of flotation*. New York: Marcel Dekker, 2004. p.19–30.

NOBLE, M.; BROWN, A.; JAUREGI, P.; KAUL, A.; VARLEY, J. Protein-recovery using gas-liquid dispersions. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.711, n.1/2, p.31-43, 1998.

OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals: Adopted by the Council on 27th July 1995: Test n.107: Partition coefficient (n-octanol/water): Shake flask method. [S.I.]: OECD Publishing, 1995. 4p. (Section 1: Physical-Chemical properties). Disponível em: <http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/free/9710701e.pdf>. Acesso em: 10/08/2011.

OH, Y.S.; SHIH, I.L.; TZENG, Y.M.; WANG, S.L. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab Shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, v.27, p.3-10, 2000.

OLIVEIRA, G.G.G.; SILVA, D.P.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M.; PESSOA Jr., A. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.37, n.2, p.176-187, 2001.

OLIVERA-NAPPA, A; LAGOMARSINO, G.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Effect of electrostatic energy on partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.807, n.1, p.81-86, 2004.

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

OSMAN, M.Y.; SHARAF, I.A.; OSMAN, H.M.; EL-KHOULY, Z.A.; AHMED, E.I. Synthetic organic food colouring agents and their degraded products: effects on human and rat cholinesterases. *British Journal of Biomedical Science*, v.61, p.128-132, 2004.

PAN, Y.; ZHU, Z.; HUANG, Z.; WANG, H.; LIANG, Y.; WANG, K.; LEI, Q.; LIANG, M. Characterisation and free radical scavenging activities of novel red pigment from *Osmanthus fragrans*' seeds. *Food Chemistry*, v.112, n.4, p.909-913, 2009.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, v.22, n.3, p.189-259, 2004.

PARK, Y.K. Produção de enzimas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Tecnologia das fermentações*. São Paulo: Edgar Blücher, 1975. p.285. (Biotecnologia, v.1).

PARK, Y.; LIANG, J.; YANG, Z.; YANG, V.C. Controlled release of clot-dissolving tissue-type plasminogen activator from a poly(L-glutamic acid) semi-interpenetrating polymer network hydrogel. *Journal of Controlled Release*, v.75, n.1/2, p.37-44, 2001.

PASTRANA, L.; BLANC, P.J.; SANTERRE, A.L.; LORET, M.; GOMA, G. Production of red pigments by *monascus mber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. *Science*, v.30, n.4, p.333-341, 1995.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. p.116-126.

PEREIRA, J.F.B.; SANTOS, V.C.; JOHANSSON, H.-O.; TEIXEIRA, J.A.C.; PESSOA Jr., A. A stable liquid-liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, v.98, p.441-450, 2012.

PEREIRA, M. Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por *Kluyvermyces marxianus*, utilizando sistemas de duas fases aquosas. Minho, 2005. pag. 193 Tese de Doutorado - Engenharia Química e Biológica - Universidade do Minho.

PESSOA Jr., A., KILIKIAN, B.V. *Purificação de produtos biotecnológicos*. Barueri: Manole, 2005. 444p.

PICCOLI-VALLE, R.H.; PASSOS, F.J.V.; BRANDI, I.V.; PETERNELLI, L.A.; SILVA, D.O. Influence of different mixing and aeration regimens on pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*. *Crop Science*, v.38, p.849-854, 2003.

PITT, J. A laboratory guide to common *Penicillium* species. North Ryde: CSIRO Food Research Laboratory, 1985. 182p.

PORTO, T.; MEDEIROS E SILVA, G.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F., PESSOA Jr., A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v.47, n.4, p.716-721, 2008.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002. p.630-632.

QUEIROGA, A.C.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Use of response surface methodology to optimize protease synthesis by a novel strain of *Bacillus* sp. Isolated from Portuguese sheep wool. *Journal of Applied Microbiology*, v.113, p.36-43, 2012.

HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems: methods and protocols. *Methods in biotechnology*. Totowa: Humana Press, 2000. 440p. (Methods in biotechnology, 11).

RANGEL-YAGUI, C.O.; LAM, H.; KAMEI, D.T.; WANG, D.I.; PESSOA Jr., A.; BLANKSCHTEIN, D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v.82, n.4, p.445-456, 2003.

RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA Jr., A.; TAVARES, L.C. Micellar solubilization of drugs. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v.8, n.2, p.147-165, 2005.

RAPER, K.B.; FENNEL, D.I. The genus *Aspergillus*. [S.l.]: Publishing Company Malabar, 1977.

RODRIGUEZ, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326p.

ROSEN, M.J. Surfactants and interfacial phenomena. 3.ed. Hoboken: Wiley Interscience, 2004. p.303-331.

ROY, D.; KOMMALAPATI, R.R.; VALSARAJ, K.T.; CONSTANT, W.D. Soil flushing of residual transmission fluid: application of colloidal gas aphron suspensions and conventional surfactant solutions. *Water Research*, v.29, n.2, p.589-595, 1995.

RUEGGER, M.J.S.; TAUK-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.27, p.205-211, 2004.

SAHA, S.; THAVASI, R.; JAYALAKSHMI., S. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their applications as antibacterial agent and food colourants. *Research Journal of Microbiology*, v.3, p.122-128, 2008.

SAMSON, R.A.; EVANS, H.C.; LAGTÉ, J.P. Atlas of Entomopathogenic fungi. New York, Heidelberg: Springer-Verlag, Berlin, 1988. p.1-187.

SANTOS, V.C.; HASMANN, F.A.; CONVERTI, A.; PESSOA Jr., A. Liquid-liquid extraction by mixed micellar systems: a new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. *Biochemical Engineering Journal*, v.56, n.1/2, p.75-83, 2011.

SARAVANAN, S.; REENA, J.A.; RAO, J.R. MURUGESAN, T.; NAIR, B.U. Phase equilibrium compositions, densities, and viscosities of aqueous two-phase poly(ethylene glycol) + poly(acrylic acid) system at various temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v.51, n.4, p.1246-1249, 2006.

SARKAR, M.; PODDAR, S. Studies on the interaction of surfactants with cationic dye by absorption spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.221, p.181-185, 2000.

SARMENTO, M.J.; PIRES, M.J.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochromo b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography, A*, v.668, p.117-120, 1994.

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

VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

SARUBBO, L.A. Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos. Campinas, 2000. pag. 510 Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, 2000.

SAVE, S.V.; PANGARKAR, V.G. Characterisation of colloidal gas aphrons. *Chemical Engineering Communications*, v.127, p.35–54, 1994.

SCAMEHORN, J.F.; HARWELL, J.H. Current trends and future developments in surfactant-based separations. In: SCAMEHORN, J.F.; HARWELL, J.H.H., ed. *Surfactant-based separations science and technology*. Washington: American Chemical Society, 2000. p.1–14. (ACS Symposium series, 740).

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p.93-121. [v.2: Engenharia bioquímica].

SEBBA, F. *Foams and biliquid foams - aphrons*. Chichester: John Wiley, 1987. 236p.

SERRA, E.J.P. VENDRUSCOLO, F.; PITOL, L.O.; NINOW, J.L. Estabilidade térmica do pigmento produzido por *Monascus ruber* em cultivo submerso. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES: SINAFERM, 15, Curitiba, 2007. Anais. Curitiba, 2007. 1 CD-room.

SHALOM, G.; PRATTEN, J.; WILSON, M.; NAIR, S.P. Cloning, heterologous gene expression and biochemical characterization of the alpha-1,3-glucanase from the filamentous fungus *Penicillium purpurogenum*. *Protein Expression and Purification*, v.60, n.2, p.170-175, 2008.

SILVA, L.H.M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*, v.29, p.1345-1351, 2006.

SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.X.; ASSIS, E.M.; ASQUIERI, E.R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores totais em mel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.3, p.337-341, 2003.

SINHA, J.; BAE, J.T.; PARK, J.P.; KIM, K.H.; SONG, C.H.; YUN, J.W. Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.56, n.1/2, p.88–92, 2001.

SIVAKUMAR, V.; ANNA, J.L.; VIJAYEESWARRI, J.; SWAMINATHAN, G. Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.16, n.6, p.782-789, 2009.

SMITH, J.J.; LILLY, M.D.; FOX, R.I. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.35, n.10, p.1011-1023, 1990.

SPIGNO, G.; DERMIKI, M.; PASTORI, C.; CASANOVA, F.; JAUREGI, P. Recovery of gallic acid with colloidal gas aphotons generated from a cationic surfactant. *Separation and Purification Technology*, v.71, n.1, p.56-62, 2010.

SPIGNO, G.; JAUREGI, P. Recovery of gallic acid with Colloidal Gas Aphrons (CGA). *International Journal of Food Engineering*, v.1, n.4, p.1-10, 2005.

STEINER, J.; SOCHA, C.; EYZAGUIRRE, J. Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.10, p.280-284, 1994.

TANFORD, C. *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*. 2.ed. New York: Wiley, 1980. 233p.

TEIXEIRA, M.F.S.; AMORIM, T.; PALHETA, R.A.; ATAYDE, H.M., orgs. *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)*. Manaus: EDUA, 2011. 224p.

TEIXEIRA, M.F.S.; MARTINS, M.S.; SILVA, J.C.; KIRSCH, L.S.; FERNANDES, O.C.C.; CARNEIRO, A.L.B.; CONTI, R.; DURÁN, N. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, v.6, n.3, p.300-311, 2012.

TENG, S.S.; FELDHEIM, W. Anka and anka pigment production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.26, n.5, p.280-282, 2001.

TEOTIA, S.; GUPTA, M.N. Purification of phospholipase D by two-phase affinity extraction. *Journal of Chromatography, A*, v.1025, p.297-301, 2004.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 780p.

ULLMANN'S *Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2.ed. Weinheim: Weinheim: VCH, 1985. 36v.

UNAGUL, P.; WONGSA, P.; KITTAKOOP, P.; INTAMAS, S.; SRIKITIKULCHAI, P.; TANTICHAROEN, M. Production of red pigments by the insect pathogenic

fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.32, n.4, p.135-140., 2005.

VECCHIA, A.D.; CASTILHOS-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n.2, p.324-327, 2007.

VELMURUGAN, P.; KAMALA-KANNAN, S.; BALACHANDAR, V.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; CHAE, J.-C.; OH, B.-T. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, v.79, n.2, p.262-268, 2010a.

VELMURUGAN, P.; LEE, Y.H.; VENIL, C.K., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; CHAE, J.C.; OH, B.T. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.109, n.4, p.346-50, 2010b.

VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R.L.; CUNHA, A.S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros*, v.20, n.1, p.51-64, 2010.

WANG, H.S.; PAN, Y.M.; TANG, X.J.; HUANG, Z.Q. Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans*' seeds. *LWT- Food Science and Technology*, v.39, n.5, p.496-502, 2006.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, v.23, n.2, p.115-129, 2005.

WANG, Y.-H.; YANG, B.; REN, J.; DONG, M.-L.; LIANG, D.; XU, A.-L. Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry*, v.40, n.3/4, p.1161-1166, 2005.

WISSGOTT, U.; BORTLIK, K.I. Prospects for new natural food colorants. *Trends in Food Science & Technology*, v.7, n.9, p.298-302, 1996.

XU, C.P.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; YUN, J.W. Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. *Bioresource Technology*, v.97, n.5, p.770-777, 2006.

YANG, H.; XIAO, C.; MA, W.; HE, G. The production of hypocrellin colorants by submerged cultivation of the medicinal fungus *Shiraia bambusicola*. *Dyes and Pigments*, v.82, n.2, p.142-146, 2009.

YU, X.; WANG, Y.; WEI, G.; DONG, Y. Media optimization for elevated molecular weight and mass production of pigment-free pullulan. *Carbohydrate Polymers*, v.89, n.3, p.928-934, 2012.

ZAFAR, M.; KUMAR, S.; KUMAR, S.; DHIMAN, A.K. Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 by using genetic algorithm based on artificial neural network and response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.1, n.1, p.70-79, 2012.

ZASLAVSKY, B.Y. *Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications*. New York: Marcel Dekker, 1995. 696p.

ZEA, D.V.L.; MAYERHOFF, A.; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering Journal*, n.18, p.217-223, 2004.

ZHANG, C.; LILLIE, R.; COTTER, J.; VAUGHAN, D. Lysozyme purification from tobacco extract by polyelectrolyte precipitation. *Journal of Chromatography, A*, v.1069, n.1, p.107-112, 2005.

ZHANG, H.; ZHAN, J.; SU, K.; ZHANG, Y. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, λ -actinorhodin. *Food Chemistry*, v.95, n.2, p.186-192, 2006.

ZNIDARSIC, P.; PAVKO, A. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology*, v.39, n.3, p.237-252, 2001.

ROSSI, T. Corantes naturais: fontes, aplicações e potencial para uso da madeira. In: INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS. Disponível em: <http://www.ipef.br/tecprodutos/corantes.asp>. Acesso em: 10 nov. 2012.

<http://www.abiquim.org.br/comissao/setorial/corantes-pigmentos/especificidade/historico-aplicacao>. Acesso em: 10 nov. 2012.

SCIENCE CLARIFIED. Di-EI. Dyes and Pigments. Disponível em: <http://www.scienceclarified.com/Di-EI/Dyes-and-Pigments.html>. Acesso em: 10 nov. 2012.

1. APÊNDICE

1.1 Apêndice A. Estabelecimento da Metodologia de Determinação da Concentração de Sacarose

Os monossacarídeos, como glicose e frutose, por apresentarem uma função aldeídica e uma cetônica livre, respectivamente, estão capacitados a reduzir cátions como cobre e prata transformando-se simultaneamente em produtos mais oxidados. Como a sacarose, porém, contém em sua estrutura dois resíduos de monossacarídeos com comprometimento de seus grupos anoméricos, esse dissacarídeo não tem capacidade de promover tais reduções. Há necessidade de um tratamento hidrolítico prévio, que pode ser feito em meio ácido forte ou com a interferência de enzimas. O método fenol sulfúrico é um método simples, rápido, sensível e com resultados reprodutíveis (Demiate *et al.*, 2002), sendo que nesta metodologia a hidrólise da sacarose é dispensada, uma vez que utiliza ácido sulfúrico concentrado. Demiate *et al.*, (2002), compararam os resultados desta metodologia com os obtidos pelos métodos de Somogyi-Nelson e Lane-Eynon após hidrólise ácida e enzimática de amostras contendo sacarose e os resultados indicaram que os métodos não apresentam diferença significativa ao nível de 1% de significância. Estes resultados foram similares aos obtidos por Silva *et al.*, (2003) que compararam a metodologia fenol sulfúrico com diversos métodos de determinação de açúcares totais. Dessa maneira, a metodologia fenol sulfúrico foi utilizada na determinação de sacarose no meio fermentado.

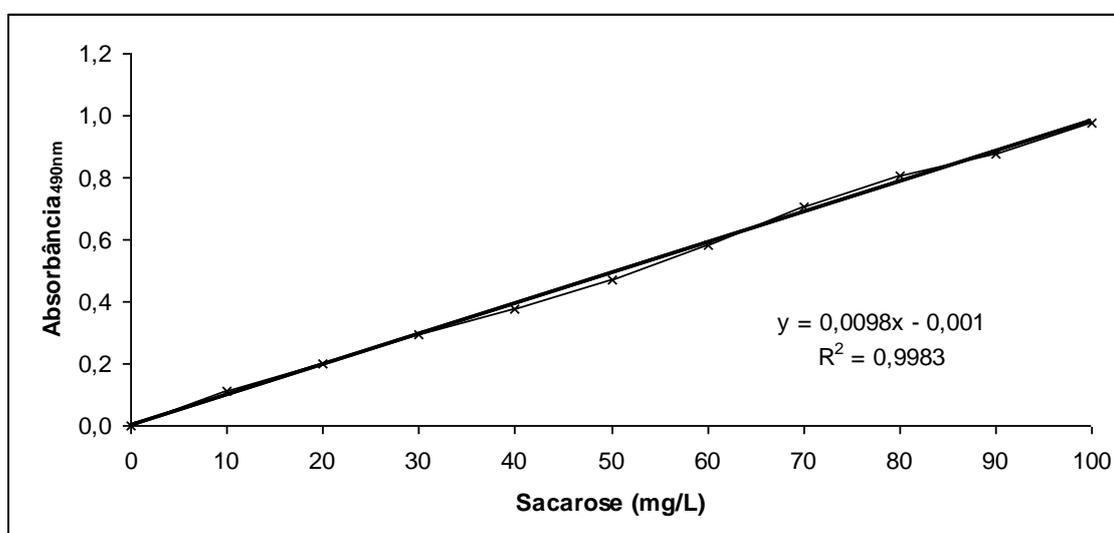


Figura 42. Curva de calibração de absorvância em função da concentração de sacarose obtida experimentalmente.

1.2 Apêndice B.

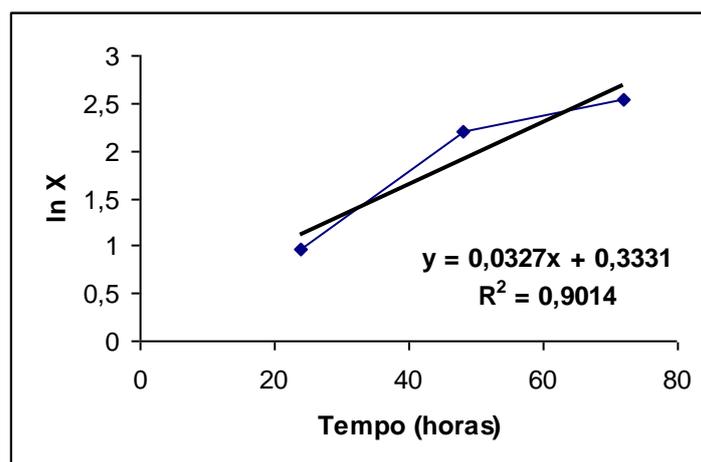


Figura 43. Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para a inoculação com suspensão de esporos.

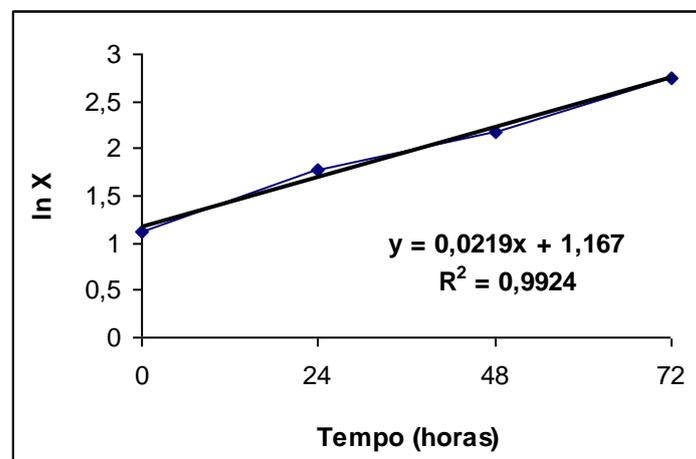


Figura 44. Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para a inoculação com discos de micélio.

1.3 Apêndice C.

1.3.1 Apêndice C.1. Biomassa, consumo de sacarose, pH e produção de colorantes para o planejamento fatorial completo 2^{4-1} .

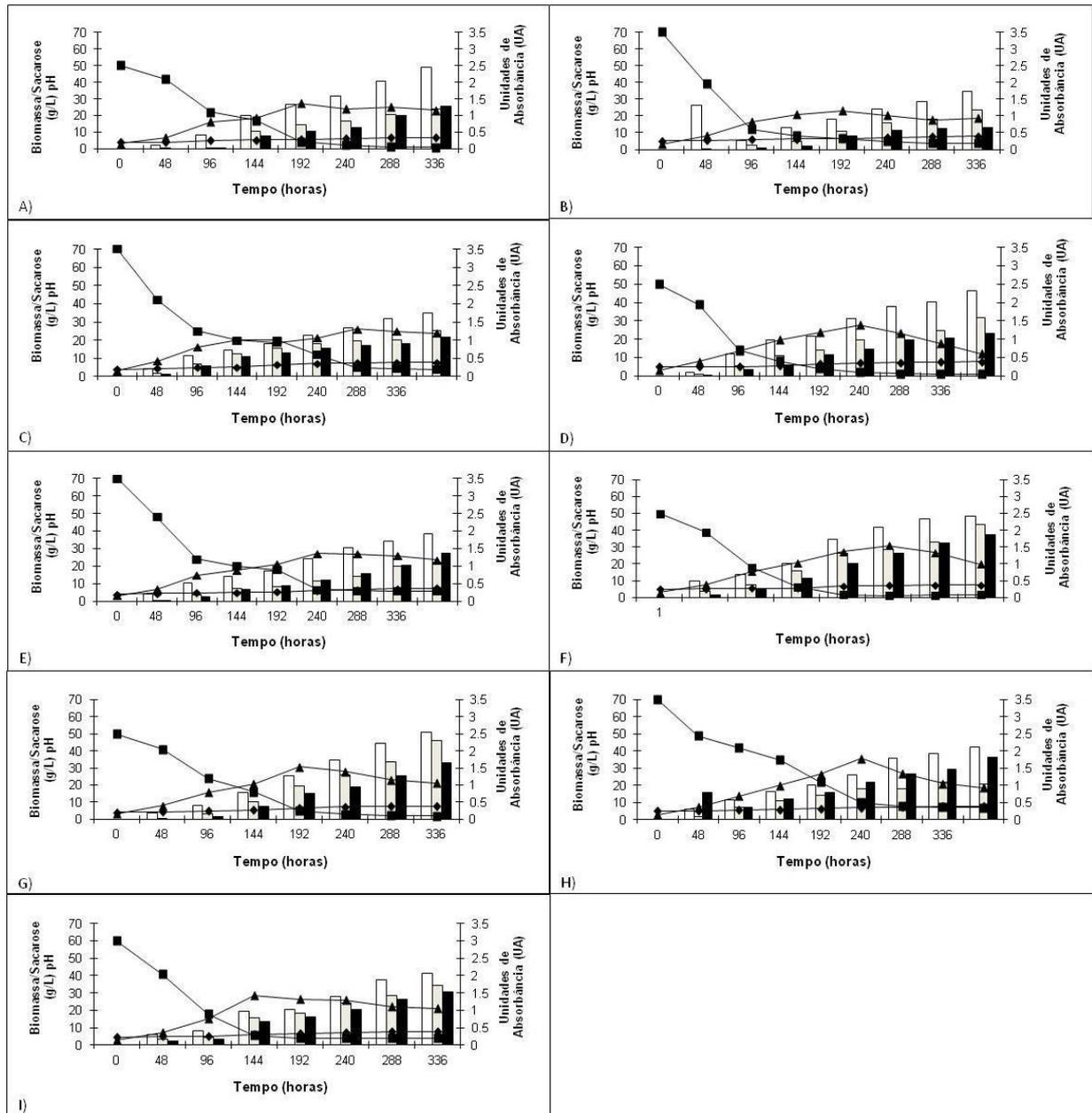


Figura 45. Biomassa (\blacktriangle), consumo de sacarose (\blacksquare), pH (\blacklozenge) e produção de colorantes amarelos (barras brancas, UA_{400nm}), laranjas (barras mescladas, UA_{470nm}) e vermelhos (barras cinzas, UA_{490nm}) para os ensaios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H) e ponto central (I) do planejamento fracionário 2^{4-1} .

1.3.2 Apêndice C.2. Biomassa, consumo de sacarose, pH e produção de colorantes para o planejamento fatorial completo 2^3 .

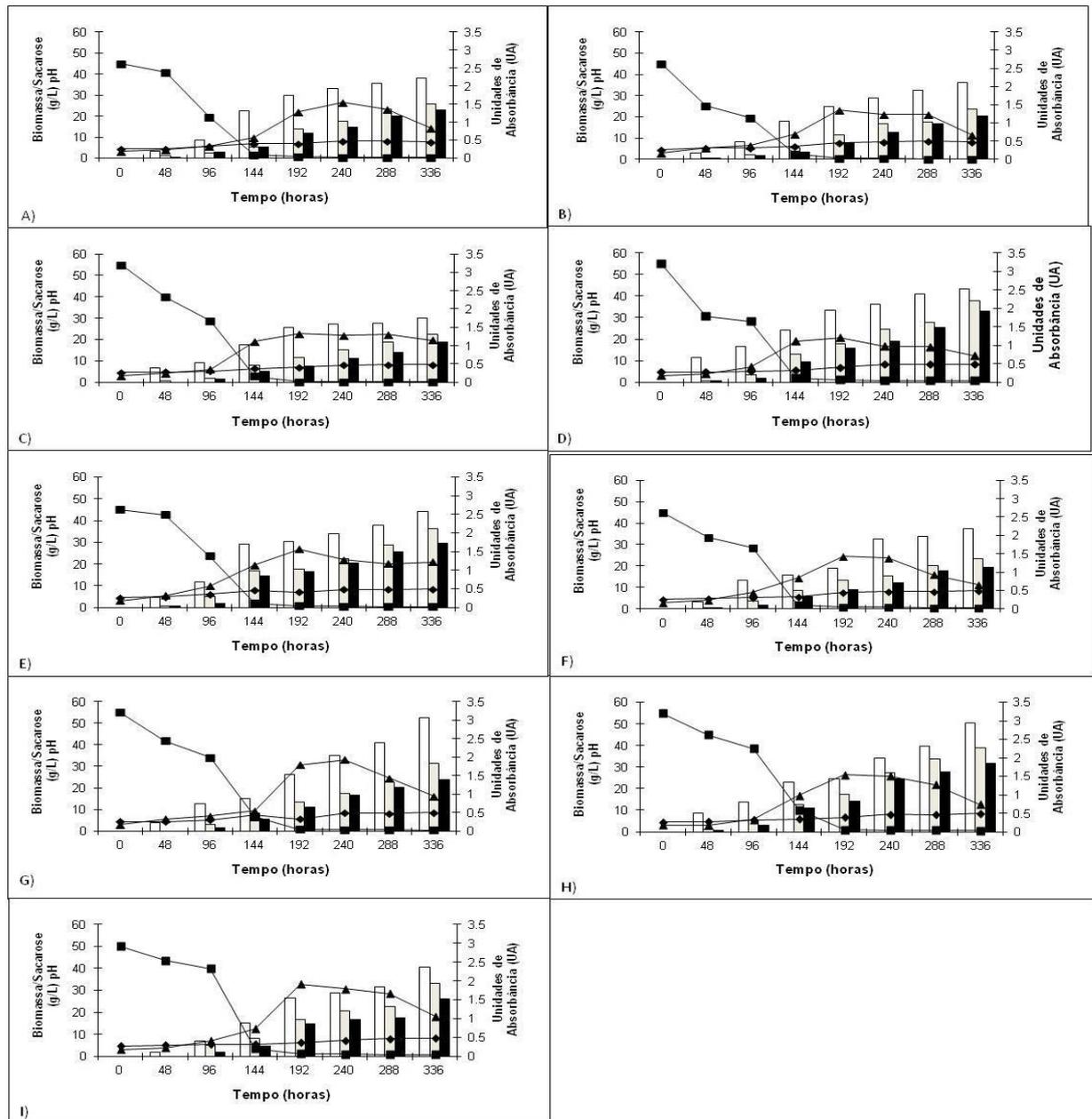


Figura 46. Biomassa (▲), consumo de sacarose (■), pH (◆) e produção de colorantes amarelos (barras brancas, UA_{400nm}), laranjas (barras mescladas, UA_{470nm}) e vermelhos (barras cinzas, UA_{490nm}) para os ensaios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H) e ponto central (I) do planejamento fatorial completo 2^3 .

1.3.3 Apêndice C.3. Biomassa, consumo de sacarose, pH e produção de colorantes para o planejamento fatorial composto 2².

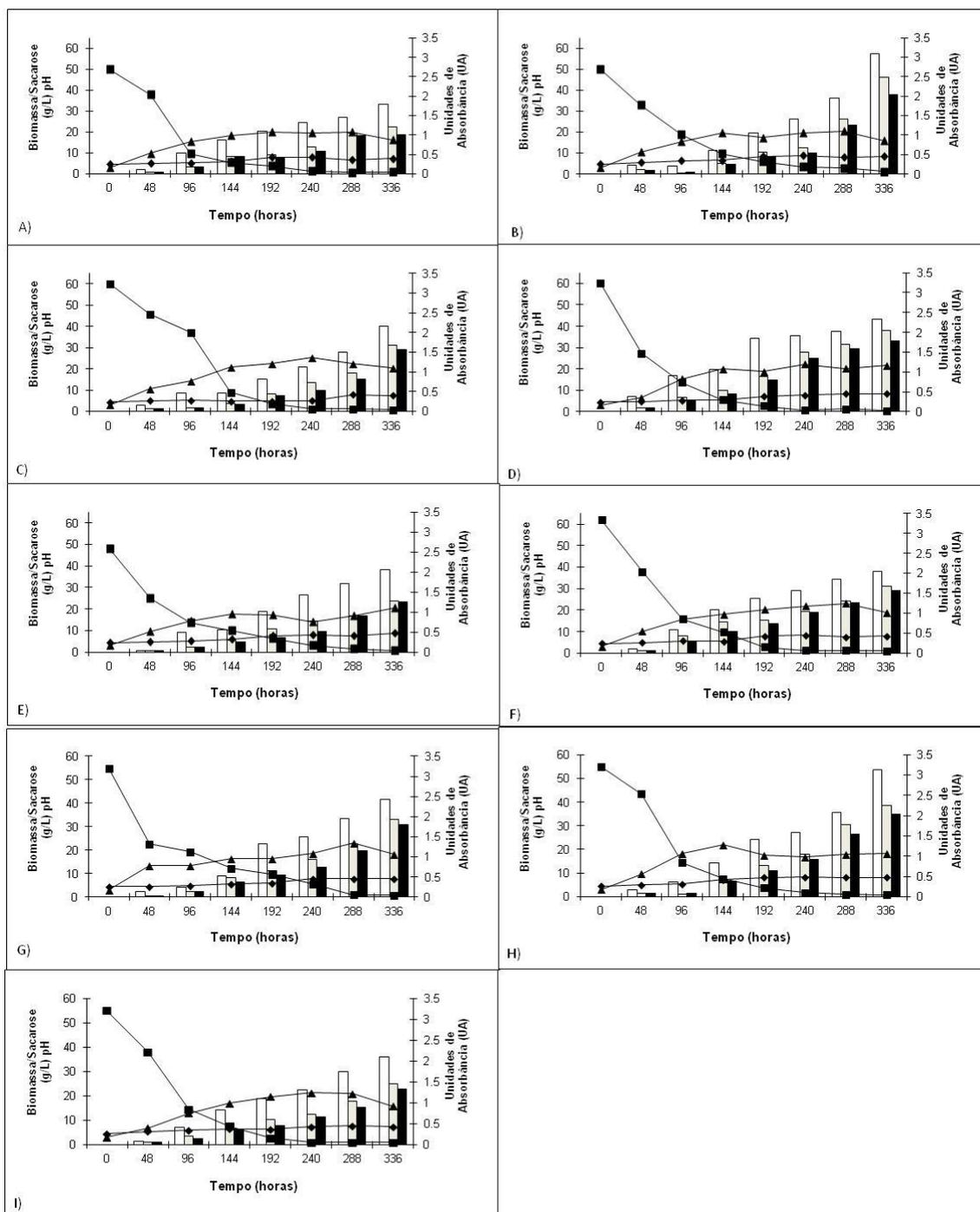


Figura 47. Biomassa (▲), consumo de sacarose (■), pH (◆) e produção de colorantes amarelos (barras brancas, UA_{400nm}), laranjas (barras mescladas, UA_{470nm}) e vermelhos (barras cinzas, UA_{490nm}) para os ensaios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H) e ponto central (I) do planejamento fatorial central composto 2².