Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Campus do Pantanal

LAÍS ROCHA DE SÁ

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTO VERMELHO POR UM FUNGO ISOLADO NO PANTANAL SUL-MATO- GROSSENSE

CORUMBÁ - MS
Novembro/2021

LAÍS ROCHA DE SÁ

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTO VERMELHO POR UM FUNGO ISOLADO NO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus do Pantanal como requisito para aprovação no Componente Curricular “Trabalho de Conclusão de Curso”.

Orientadora: Dra. Nayara Fernanda Lisboa Garcia

CORUMBÁ - MS
Novembro/2021

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelo apoio e incentivo. Sem a compreensão e ajuda de vocês não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Anthony, Samuel e Ranielly, por sempre estarem dispostos a me ajudar no que for preciso, incluindo me fazer sorrir.

À minha orientadora Nayara, por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava.

Agradeço à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela oportunidade.

Resumo

Pigmentos produzidos por fungos são uma boa alternativa para substituir os pigmentos de origem sintética, no entanto para que sua produção industrial seja viável economicamente é necessário que seu rendimento seja otimizado. Portanto, o objetivo do presente estudo foi otimizar a produção do pigmento extracelular produzido por uma linhagem fúngica isolada de amostras de solo da região Oeste do Pantanal Sul-Mato-Grossense. Foram isolados 12 fungos filamentosos, sendo um produtor de pigmento extracelular de coloração vermelha, inicialmente denominado ISO 15. O isolado apresenta colônia com cor verde e borda branca, textura camurça, aspecto seco e verso enrugado. Ao avaliar a estimativa de rendimento do pigmento, o microrganismo apresentou produção somente na condição estática, a qual apresentou pico da produção em 495 mn, com 1,1 de absorbância. O maior rendimento de pigmento vermelho bruto foi produzido em meio caldo Glicose e Extrato de levedura (GY), pH 5,5 a 30°C, sem agitação durante 7 dias de cultivo, obtendo λmáx de 4,335 a 495 nm. O pigmento apresentou elevada estabilidade obtendo 93,56% de atividade residual após 3 horas a 50°C. Nossos resultados demonstram que a otimização dos parâmetros de cultivo pode aumentar a produção do pigmento de interesse pelo fungo selecionado.

SUMÁRIO

Introdução **6**

Metodologia **7**

Coleta e isolamento do microrganismo 7

Manutenção dos microrganismos 7

Inóculo 7

Cultivo do fungo e estimativa de rendimento do pigmento 7

Otimização da produção de pigmentos fúngicos 8

Produção de pigmentos em diferentes meios de cultivo 8

Efeito da temperatura para produção de pigmentos 8

Efeito do pH inicial do meio na produção de pigmento 8

Caracterização do pigmento produzido 8

Estabilidade do pigmento produzido em diferentes temperaturas 8

Análise estatística 9

Resultados e discussão **9**

Isolamento e caracterização do fungo produtor de pigmento 9

Estimativa da produção de pigmento 10

Otimização da produção 11

Efeito do meio de cultivo na produção de pigmento 11

Efeito da temperatura, pH e tempo de cultivo na produção do pigmento 12

Caracterização do pigmento produzido 14

Estabilidade do pigmento produzido em diferentes temperaturas 14

Conclusão **15**

Referências **15**

1 Introdução

Pigmentos naturais têm sido cada vez mais utilizados pelas indústrias farmacêutica, têxtil e alimentícia por se apresentarem como alternativa ao uso de pigmentos químicos, devido ao aumento da preocupação do mercado consumidor com os riscos a longo prazo sobre a toxicidade, carcinogenicidade e alergias (RAMESH e MUTHURAMAN, 2018; WANG *et al.*, 2020), além de outros problemas toxicológicos potenciais associados aos pigmentos químicos. Dentre as formas de contornar esses riscos está a utilização de pigmentos de origem biológica.

Biopigmentos podem ser produzidos por animais, plantas e microrganismos, contudo, pigmentos de origem vegetal ou animal possuem algumas desvantagens como, por exemplo, instabilidade dos compostos e produção dependente da estação sazonal do ano. Por outro lado os pigmentos provenientes de microrganismos ocorrem em ambiente controlado, apresentam elevado rendimento e sua produção pode ser melhorada por ensaios de otimização (BOUHRI *et al.*, 2020; SÁNCHEZ-MUÑOZ *et al.*, 2020).

Entre os microrganismos produtores de pigmento, fungos filamentosos têm se destacado por produzirem pigmentos extracelulares, o que reduz o custo e o tempo de produção (KALRA, CONLAN e GOEL, 2020). Pigmentos produzidos por fungos filamentosos possuem ainda propriedades de propriedades antimicrobianas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010), além disso, apresentam alta estabilidade química quanto a variações de pH e temperatura e baixa geração de resíduos (SUWANNARACH *et al*., 2019).

No entanto, para que a produção de biopigmentos fúngicos seja economicamente viável é necessário prospectar microrganismos com elevado potencial produtivo de pigmentos e otimizar os parâmetros de cultivo destes microrganismos. Realizar a busca por fungos produtores de pigmentos em ambientes pouco explorados aumenta a possibilidade de encontrar novas cepas e novas moléculas . Neste sentido o Pantanal é um dos biomas brasileiros que possui a menor quantidade de espécies de fungos identificadas(PANDEY *et al.*, 2018; FORZZA *et al.*, 2010).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi otimizar a produção de pigmento extracelular produzido por uma linhagem fúngica isolada de amostras de solo da região Oeste do Pantanal Sul-Mato-Grossense e verificar a sua estabilidade em diferentes temperaturas.

2 Metodologia

2.1 Coleta e isolamento do microrganismo

Foram coletadas amostras de solo do Pantanal Sul-Mato-Grossense, no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. As amostras foram diluídas seriadamente em solução salina a 0,85% e 100 µL foi inoculado em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido de 0,25 g/L de tetraciclina. As placas foram incubadas a 28ºC, e as colônias foram replaqueadas para obter colônias puras.

2.2 Manutenção dos microrganismos

Os microrganismos isolados foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado. Posteriormente ao crescimento, os microrganismos foram preservados em geladeira a temperatura de 5°C

2.3 Inóculo

O microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de BDA inclinado, mantido por 7 dias a 28°C. A suspensão do fungo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de caldo Batata Dextrose (BD). A inoculação do microrganismo se deu pela transferência de 2,5 mL dessa suspensão em 50 mL do meio de cultivo.

2.4 Cultivo do fungo e estimativa de rendimento do pigmento

O cultivo foi realizado em caldo BD a 28°C sob a agitação de 100 rpm em mesa agitadora e em condições estáticas. Após a incubação, as culturas foram filtradas com duas camadas do tecido *voil,* centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos, posteriormente a produção de pigmento foi avaliada. A análise da

produção de pigmentos foi realizada pela medição do nível máximo de absorbância (AU) do pigmento utilizando um espectrofotômetro em uma faixa de 410 a 530 nm.

2.5 Otimização da produção de pigmentos fúngicos

2.5.1 Produção de pigmentos em diferentes meios de cultivo

A produção de pigmento foi avaliada em diferentes meios de cultivo, sendo: Batata Dextrose (BD), Czapek, Glicose e Extrato de Levedura (GY) e meio de Farelo de Trigo em estado estático a 28°C durante 7 dias. O meio de cultivo que apresentou maior produção de pigmento foi utilizado nos experimentos subsequentes.

2.5.2 Efeito da temperatura para produção de pigmentos

A temperatura ótima de produção de pigmento pelo fungo foi avaliada pela incubação da cultura em temperaturas de 25, 28 e 30°C por 7 dias de cultivo estático, no respectivo meio de cultivo selecionado anteriormente. A maior máxima produção de pigmentos foi determinada pela medição do nível máximo de AU de pigmentos usando um espectrofotômetro.

2.5.3 Efeito do pH inicial do meio na produção de pigmento

O efeito do pH na produção de pigmento pelo fungo foi avaliado nos valores de pH 3,0 – 8,0, durante 7 dias de cultivo estático, na temperatura ótima obtida anteriormente. O pH do meio foi ajustado com NaOH e H_2SO_4. A máxima produção de pigmento foi determinada pela medição do nível máximo de AU de pigmentos usando um espectrofotômetro.

2.6 Caracterização do pigmento produzido

2.6.1 Estabilidade do pigmento produzido em diferentes temperaturas

A termoestabilidade do pigmento em meio líquido foi determinada incubando os pigmentos por 3 horas em diferentes temperaturas (25–50°C), com incrementos de 5°C. O λmáx em 495 nm foi registrado a cada hora. A porcentagem da estabilidade foi realizada de acordo com Suwannarach *et al.* (2019), usando a seguinte fórmula:

Porcentagem de estabilidade = (Af/Ai) x 100

Onde Af é o valor da AU do pigmento depois do tratamento e Ai é a AU antes do tratamento.

2.7 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados foram apresentados como a média de três ensaios independentes. A análise estatística dos dados incluiu ANOVA seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 1%.

3 Resultados e discussão

3.1 Isolamento e caracterização do fungo produtor de pigmento

Foram isoladas 12 linhagens de fungos filamentosos, apenas um isolado (inicialmente denominado ISO15) apresentou produção de pigmento vermelho extracelular e foi selecionado para este estudo. O microrganismo ISO15 é caracterizado por colônias de cor verde, borda branca, textura camurça e aspecto seco quando inoculado em meio BDA por 7 dias a 28°C. O verso da colônia é enrugado e possui coloração vermelha em razão da produção do pigmento extracelular(Figura 1). A produção do pigmento concentra-se na região central e irradia para as bordas da colônia.

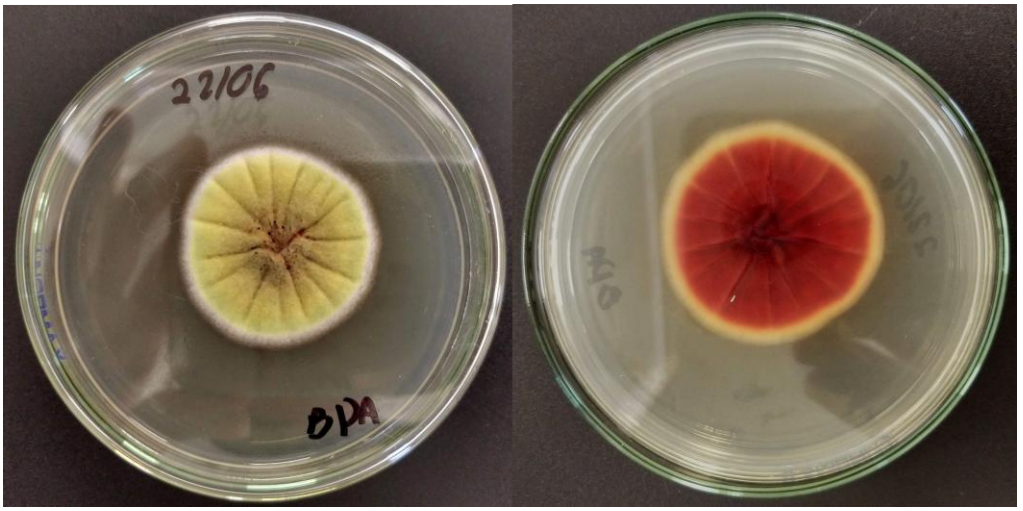

Figura 1. Anverso (A) e reverso (B) da colônia do ISO 15 após 7 dias de cultivo a 28°C em meio BDA.

3.2 Estimativa da produção de pigmento

A quantificação de pigmento produzido pelo ISO15 foi realizada cultivando o microrganismo em Caldo BD em condições de cultivo sob agitação e estático. Entretanto, o microrganismo apresentou produção pigmentar no cultivo estático.

O comprimento de onda de AU máxima no cultivo em meio BDA estático foi obtido em 495 nm, com 1,1 de AU (Figura 2), sendo este comprimento de onda selecionado para avaliar o rendimento total do pigmento nas etapas subsequentes.

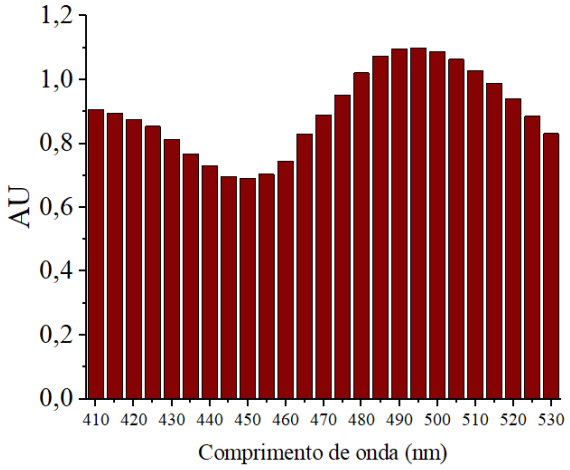

Figura 2. Espectro de varredura do pigmento produzido por ISO 15 por cultivo submerso em caldo BD após 7 dias a 28°C.

3.3 Otimização da produção

3.3.1 Efeito do meio de cultivo na produção de pigmento

Dentre os meios líquidos avaliados, o maior rendimento de pigmento vermelho bruto foi obtido em meio caldo GY com 2,428 de AU em 495 nm. Enquanto nos meios BD, Czapek e Farelo de Trigo apresentaram respectivamente 1,1, 0,160 e 0,043 UA_{495} (Figura 3). Devido a maior produção do biopigmento em meio GY, o mesmo foi utilizado nos ensaios seguintes.

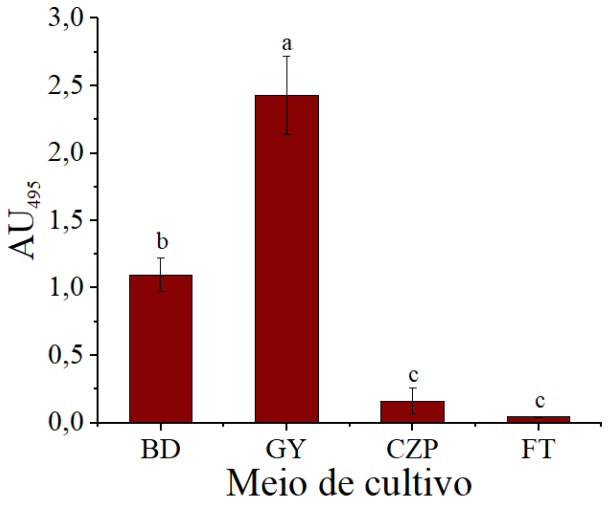

Figura 3. Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de pigmento vermelho por cultivo submerso pelo isolado ISO15 em diferentes meios após 7 dias a 28°C. Legenda: BD (Batata Dextrose), GY (Glicose e Extrato de Levedura), CZP (Czapek), FT (Farelo de Trigo).

Os resultados obtidos em meios contendo glicose (BD e GY) podem indicar que esse carboidrato favorece a produção do biopigmento evidenciando que a produção de pigmentos por fungos filamentosos é afetada pela fonte de carbono (SÁNCHEZ-MUÑOZ *et al.*, 2020). Suwannarach *et al.* (2019) relataram resultados semelhantes ao encontrado neste estudo onde a maior produção de pigmento por *Nigrosprora aurantiaca* foi obtida em meio GY. No entanto, o efeito da glicose sobre a produção não foi observado nos estudos de Zhang *et al.* (2013), onde a produção do *Monascus purpureus* é menor em meios onde a fonte de carboidrato é a glicose.

3.3.3 Efeito da temperatura, pH e tempo de cultivo na produção do pigmento

O efeito da temperatura sobre a produção de pigmento foi avaliado incubando o microrganismo em diferentes temperaturas (25–45°). A máxima produção de pigmento foi obtida nos cultivos a 30°C, apresentando 3,147 UA_{495}, enquanto em 25°C foi obtido 1,859 UA_{495} e 35°C apenas 0,037 UA_{495} (Figura 4A). Não foi observado produção de pigmento pelo ISO15 quando o mesmo foi incubado em 40 e 45°C.

Entre os valores de pH avaliados, a maior produção de pigmento foi obtido em pH de 5 a 6, tendo como maior média 4,335 UA_{495} quando cultivado em meio GY com pH ajustado para 5,5 (Figura 4B).

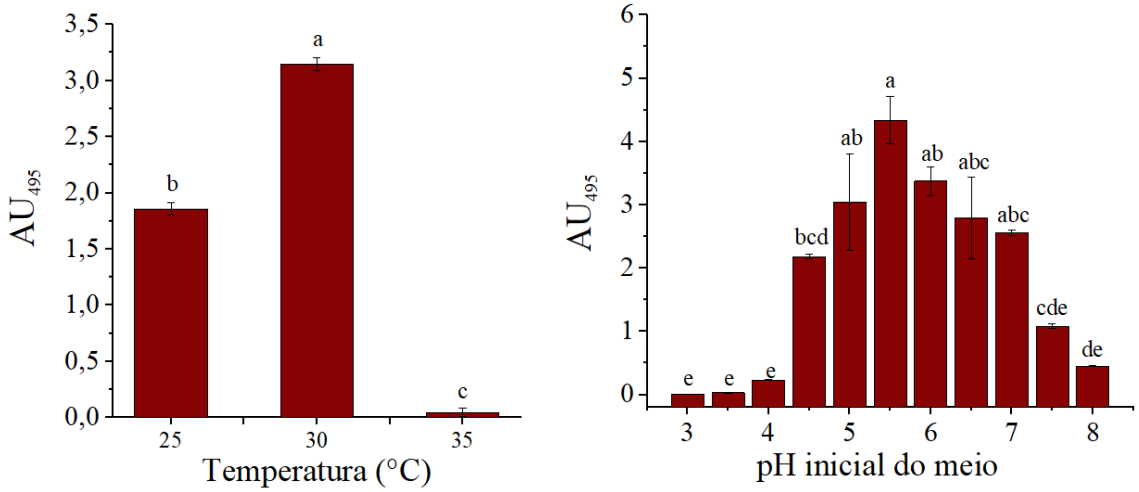

Figura 4. Efeito da (A) temperaturas e (B) pH na produção de pigmento vermelho por cultivo submerso pelo isolado ISO15 em meio GY após 7 dias.

Fatores como temperatura, pH e condições nutricionais afetam significativamente a biossíntese de metabólitos secundários (Méndez *et al.* 2011), em parâmetros inferiores ou superiores aos descritos como ótimo, foi observado

redução das atividades metabólicas com consequente inibição da produção de pigmento.

O aumento da produção de pigmento desencadeada por mudanças nas condições de cultivo também foi descrita em outros estudos. Segundo Pandey *et al*. (2018), um isolado do gênero *Penicillium* apresentou maior produção do pigmento em 495 nm em meios com pH 3,0 e sob a temperatura de 15 e 35°C no 15º dia de cultivo. Enquanto Suwannarach *et al.* (2019), ao estudar uma linhagem de *Nigrospora aurantiaca* relatou a maior produção em meio GY a 27°C e pH 5,0.

O efeito do tempo de cultivo sobre a produção de pigmento também foi determinado. A produção do pigmento iniciou-se no 4º dia de cultivo (0,069 AU) com produção máxima de pigmento no 15° dia, pH 5,5 a 30°C em caldo GY (Figura 5), no entanto, não houve diferença significativa na produção de pigmento entre o 12° ao 15° dia.

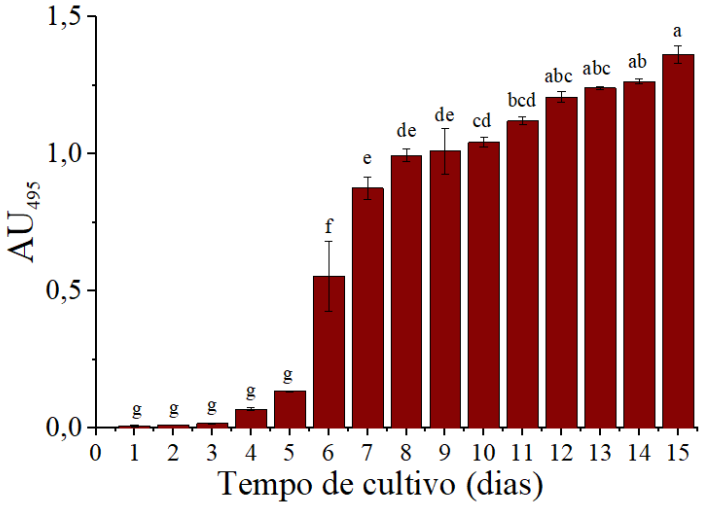

Figura 5. Efeito do tempo de cultivo na produção de pigmento vermelho por cultivo submerso pelo isolado ISO 15, pH 5,5 a 30°C.

O tempo de cultivo é um fator que influencia a produção de pigmento e consequentemente seu custo de aplicação. Fungos filamentosos geralmente requerem longos períodos quando incubados em cultivos submersos, resultando em elevado estresse no meio de cultivo, o que pode estimular a produção de pigmentos pelo microrganismo. Esse estresse pode ser resultado do esgotamento

de nutrientes e do acúmulo de produtos residuais (USMAN *et al*, 2018).

A otimização das condições de cultivo se mostraram essenciais para maximizar a produção de pigmento pelo ISO 15. Diversos autores relatam a importância da otimização das condições de cultivo para aumentar a produção de metabólitos por fungos filamentosos e consequentemente reduzir os custos de aplicação (ZHANG *et al.*, 2013; PANDEY *et al.*, 2018; SUWANNARACH *et al.*, 2019).

3.4 Caracterização do pigmento produzido

3.4.1 Estabilidade do pigmento produzido em diferentes temperaturas

A estabilidade do pigmento em diferentes temperaturas é uma das principais características buscadas para a aplicação industrial (VENIL *et al.*, 2020). O pigmento produzido pelo ISO15 manteve sua atividade original após 3 horas de incubação em diferentes temperaturas, apresentando 93,56% após 3 horas de incubação a 50°C, tendo a maior termoestabilidade em 35°C restando 99,52% de atividade residual (Figura 6).

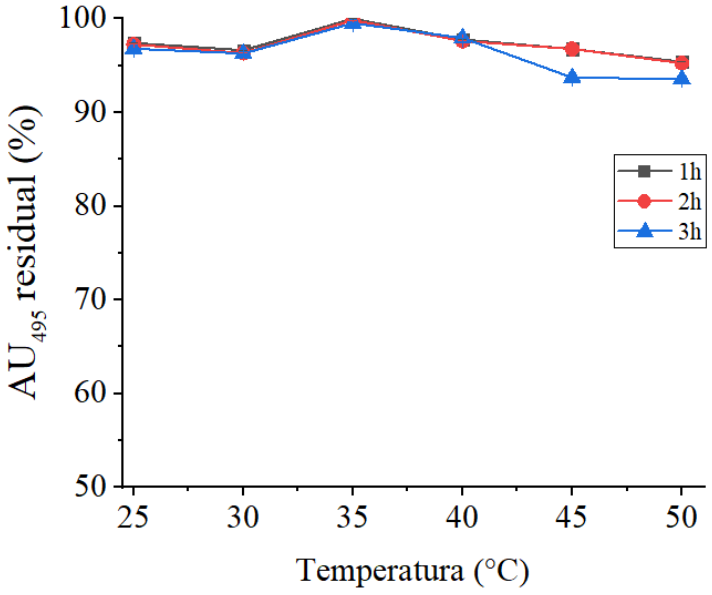

Figura 6. Absorbância residual do pigmento após ser submetido a temperatura de 25°C a 50° por 1, 2 e 3 horas.

Esse resultado também foi observado por Suwannarach *et al.*, 2019, onde não

houve perda da cor do pigmento fúngico quando submetido a faixa de temperatura de 20–80°C por 2 horas. Resultados semelhantes foram corroborado por Sastrawidana, Maryam e Sukarta (2016), onde o pigmento se manteve estável entre 30–80°C durante 15 minutos. Termoestabilidade de pigmentos fúngicos também foi relatado em períodos mais longos (25 horas) em temperaturas inferiores a 60°C (CARVALHO *et al.*, 2005).

4 Conclusão

O fungo ISO15 apresentou capacidade para produzir pigmento extracelular vermelho, sendo o maior rendimento obtido no meio GY, pH 5,5 a 30°C, sem agitação em 12 dias. O biopigmento produzido também apresentou elevada termoestabilidade em 50°C por 3 horas.

Nossos resultados demonstram a importância da otimização dos parâmetros de cultivo. As características descritas, somadas à expressiva produção do pigmento vermelho pela linhagem selecionada estimulam a caracterização e aplicação industrial deste biopigmento.

5 Referências

BOUHRI, Y.; ASKUN, T.; TUNCA, B.; DENIZ, G.; AKSOY, S.; MUTLU, M. The orange-red pigment from *Penicillium mallochii*: Pigment production, optimization, and pigment efficacy against Glioblastoma cell lines. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 1-11, 2020.

CARVALHO, J. C.; OISHI, B. O.; PANEY, A.; SOCCOL, C. R. Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 48, p. 885-894, 2005.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (org.). **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2. ed. Caxias do Sul: Educs, 2010. 638 p.

FORZZA, R. C. et al (org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, v. 1, 2010.

KALRA, R.; CONLAN, X. A.; GOEL, M. **Fungi as a Potential Source of Pigments**:

Harnessing Filamentous Fungi. Frontiers in Chemistry, v. 8, p. 1-22, 2020.

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. **Biomedicine & Biotechnology**, v. 12, p. 961-968, 2011.

PANDEY, N.; JAIN, R.; PANDEY, A.; TAMTA, S. Optimisation and characterisation of the orange pigment produced by a cold adapted strain of *Penicillium* sp. (GBPI_P155) isolated from mountain ecosystem. **Mycology**, v. 9 (2), p. 81–92, 2018.

RAMESH, M.; MUTHURAMAN, A. Flavoring and Coloring Agents: health risks and potential problems. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. (ed.). **Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes**. [S.l.]: Academic Press, 2018. Cap. 1. p. 1-28.

SÁNCHEZ-MUÑOZ, S.; MARIANO-SILVA, G.; LEITE, M. O.; MURA, F. B.; VERMA, M. L.; SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. Production of fungal and bacterial pigments and their applications. In: VERMA, M. L.; CHANDEL, A. K. **Biotechnological Production of Bioactive Compounds**. 1ª Edição. ed. [S.l.]: Elsevier, 2020. Cap. 11, p. 327-361.

SASTRAWIDANA, I. D. K.; MARYAM, S.; SUKARTA, I. N. Natural dyeing of silk and cotton fabric with red pigment from penicillium purpurogenum which is isolated from goat milk contaminated soil. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 6, p. 32 - 37, 2016.

SUWANNARACH, N.; KUMLA, J.; NISHIZAKI, Y.; SUGIMOTO, N.; MEERAK, J.;MATSUI, K.; LUMYONG, S. Optimization and characterization of red pigment production from an endophytic fungus, *Nigrospora aurantiaca* CMU-ZY2045, and its potential source of natural dye for use in textile dyeing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 6973–6987, 2019.

USMAN, H. M.; FAROUQ, A. A.; BAKI, A. S.; ABDULKADIR, N.; MUSTAPHA, G. Production and characterization of orange pigment produced by Halophilic bacterium *Salinococcus roseus* isolated from Abattoir soil. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 6, p. 238-243, 2018.

VENIL, C. K., VELMURUGAN, P.; DUFOSSÉ, L. DEVI, P. R.; RAVI, A. V. **Fungal Pigments**: Potential Coloring Compounds for Wide Ranging Applications in Textile Dyeing. Journal of Fungi, v. 6, p. 1 - 23, 2020.

WANG, B.; SU, Y.; TIAN, L.; PENG, S.; JI, R. **Heavy metals in face paints**: Assessment of the health risks to Chinese Opera Actors. Science of the Total Environment, v. 724, p.1-8, 2020.

ZHANG, L.; LI, Z.; DAI, B.; ZHANG, W.; YUAN, Y. Effect of submerged and solid-state fermentation on pigment and citrinin production by *Monascus purpureus*. **Acta Biologica Hungarica**, v. 64, p. 385–394, 2013.