

PRODUÇÃO DE CORANTES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS ESPÉCIES *Piper aduncum*, *Caesalpinia ferrea* e *Himatanthus sucuuba*

Maria Auxiliadora Fernandes de MACEDO¹; Júlia Ignez SALEM²; Alita Moura LIMA²; Juliana Sarmiento Rocha Leal OLIVEIRA²; João Vicente Braga de SOUZA³

¹Bolsista PIBIC/CNPQ/INPA; ²Colaborador CPCS/INPA; ³Orientador CPCS/INPA

1. Introdução

A indústria de pigmentos é muito importante economicamente. Ela está associada a várias outras indústrias como a de alimentos, cosméticos, têxtil, construção, farmacêutica e de diagnóstico. O uso de corantes é, muitas vezes, o principal diferencial competitivo de aceitabilidade entre os produtos (Spears *et al.*, 1988). Fungos filamentosos, especificamente fungos endofíticos, são uma fonte alternativa de corantes naturais que podem ser produzidos em grandes quantidades, de forma padronizada e sem causar danos ambientais (Mapari *et al.*, 2005). O objetivo do presente estudo foi investigar a produção de corantes por fungos endofíticos isolados das espécies *Piper aduncum*, *Caesalpinia ferrea* e *Himatanthus sucuuba*. Especificamente: a) verificar, entre os isolados endofíticos, quais eram os mais promissores para produção de corantes e b) investigar quais dos bioprocessos, em estado sólido ou submerso, é mais viável para produção dos pigmentos.

2. Material de Métodos

Dez culturas de fungos endofíticos das espécies, *Piper aduncum*, *Caesalpinia ferrea* e *Himatanthus sucuuba*, foram selecionadas da coleção de microrganismos da CPCS-INPA. A reativação das culturas foi realizada como descrito por Lacaz *et al.* (2001). Um fragmento da cultura mantido sob óleo mineral foi transferido para placas de petri contendo BDA, Sabouraud e Malte, em seguida, as placas foram mantidas a temperatura ambiente. A avaliação quanto a produção dos corantes foi realizada como descrito por Mapari *et al.* (2005), durante 14 dias as culturas foram diariamente observadas a fim de detectar a produção de pigmentos extracelulares pelo meio de crescimento. Os dois isolados que produziram pigmentação mais intensa em meio de cultura, foram selecionados para os bioprocessos. O bioprocessos em meio líquido foi realizado como descrito por Hajjaj *et al.* (2000). 10^8 células dos isolados foram transferidas para erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio (glicose 20 g/L; glutamato monossódico 5 g/L; K_2HPO_4 5 g/L; KH_2PO_4 5 g/L; $CaCl_2$, 0,1 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g/L e $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,03 g/L). Estes cultivos foram incubados sob agitação orbital de 100 rpm, temperatura de 25 °C, por um período de 14 dias. O bioprocessos em meio sólido foi realizado como descrito por Babitha *et al.* (2007). Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 125 mL contendo 10g de substrato (mandioca cozida (*Manihot esculenta*) com umidade de 60%) inoculado com 10^8 células dos isolados. Estes cultivos foram incubados a temperatura de 25 °C por 14 dias. Após este período, os pigmentos produzidos foram submetidos à extração líquido-líquido com os seguintes solventes: butanol, acetato de etila e ciclohexano, com a finalidade de caracterizar a polaridade dos pigmentos. As frações foram submetidas à caracterização por espectrofotometria do visível (340-700 nm).

3. Resultados e Discussão

Dez fungos endofíticos foram selecionados para ensaios de produção de pigmentos. Estes foram selecionados na coleção, pois apresentavam produção de pigmentos nos meios de culturas utilizados para o sua conservação. Quatro destes haviam sido isolados de *Piper aduncum*, cinco isolados de *Himatanthus sucuuba* e um isolado de *Caesalpinia ferrea*. Cinco isolados puderam ser identificados em nível taxonômico de gênero como *Fusarium* sp. Com a finalidade de verificar a produção de pigmentos, os isolados foram submetidos ao ensaio de crescimento em diferentes meios de cultura: Ágar BDA, Sabouraud e Malte. O Quadro 1 apresenta os resultados desta investigação.

Quadro 1 – Características dos pigmentos extracelulares produzidos pelos fungos em diferentes meios de cultura sólido.

Isolado	Ágar BDA	Sabouraud	Malte
<i>Piper aduncum</i>			
G10	Amarelo	Amarelo	Pouco pig. amarelo
G15	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro
P73	Amarelo claro	Amarelo escuro	Amarelo claro
P79	Marrom claro	Amarelo com laranja	Laranja escuro
<i>Himatanthus sukuuba</i>			
H37	Amarelo	Laranja claro	Amarelo escuro
<i>Caesalpinia férrea</i>			
LU6	Amarelo	Amarelo claro	Amarelo escuro

Entre os dez isolados selecionados, seis apresentaram produção de pigmentos extracelular nos meios de cultura. Entre estes, quatro isolados de *Piper aduncum* (G10, G15, P73, P79), um isolado de *Himatanthus sukuuba* (H37) e um isolado de *Caesalpinia férrea* (LU6). Os isolados produziram pigmentação mais acentuada no meio Sabouraud e Malte, nestes meios foram produzidos pigmentos de cor amarela e laranja. Para realização dos bioprocessos em meio líquido e meio sólido foram utilizados os isolados *Fusarium H37* e *Fusarium LU6*, estes produziram as pigmentações mais intensas em meio sólido.

A Figura 1 apresenta os bioprocessos em que foram produzidos pigmentos. Os isolados produziram pigmentos vermelhos, no bioprocessos em estado líquido, Glutamato monossódico em prévios estudos foi considerado como fonte de nitrogênio adequada para a produção de pigmentos vermelhos e amarelos (Babitha *et al.* 2007). Os pigmentos do isolado LU6 foram solúveis em butanol (cor amarelo escuro), no acetato de etila, (amarelo claro) e foram insolúveis no ciclohexano. Os pigmentos do isolado H37 foram solúveis em butanol (cor vermelho escuro), acetato de etila (vermelho claro) e insolúveis no ciclohexano. No bioprocessos em estado sólido (mandioca cozida) apenas o isolado H37 produziu a pigmentação, essa foi solúvel em butanol (cor rosa claro) no acetato de etila (amarelo claro) e no ciclohexano insolúvel. A partir dos dados obtidos, o bioprocessos em estado líquido demonstrou-se mais adequado para a produção de pigmentos. No entanto, vários resíduos agroindustriais, tais como farelo de arroz, farelo de trigo, mandioca, têm sido explorados para a produção de pigmento (Babitha *et al.*, 2007), sendo necessários mais estudos.

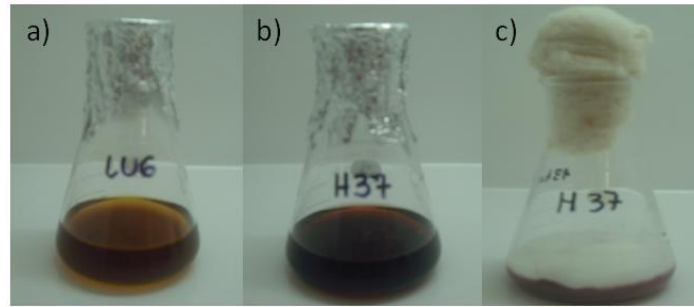


Figura 1- Bioprocessos em que foram produzidos pigmentos. a) Bioprocesso em meio líquido Isolado LU6, b) Bioprocesso em meio líquido Isolado H37, c) Bioprocesso em meio sólido Isolado H37.

A Figura 2 apresenta o espectro do visível (340-700 nm) dos pigmentos produzidos em meio líquido pelos isolados LU6 e H37. Os pigmentos dos isolados LU6 e H37, extraídos em butanol, apresentaram maiores absorções nos comprimentos de onda entre 340-420 nm. A Figura 3 apresenta o espectro do visível dos pigmentos produzidos em meio sólido pelo isolado H37, extraídos em butanol, apresentaram maiores absorções nos comprimentos de onda entre 340-530 nm. Trabalhos anteriores apresentam pigmentos vermelhos que possuem absorvidade máxima a 500 nm e amarelos a 400 nm. No entanto, a trabalhos que demonstram pigmentos vermelhos com máxima absorvidade em comprimentos de onda próximos a 400 nm (Carvalho *et al.*, 2005).

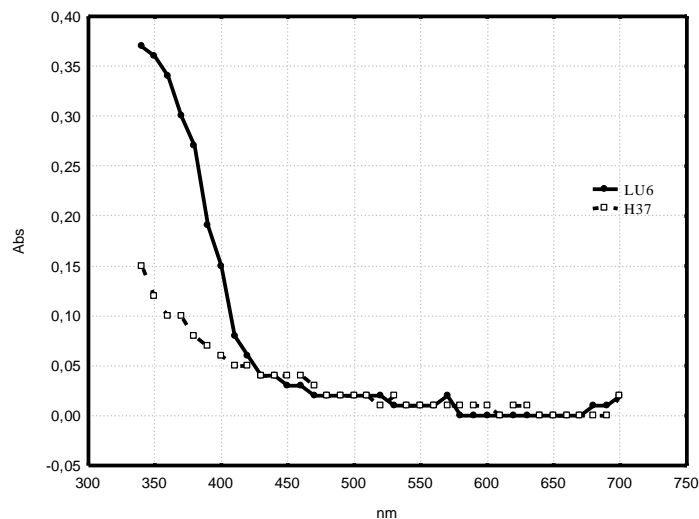


Figura 2 – Espectro do visível dos pigmentos produzidos em meio líquido pelos isolados LU6 e H37

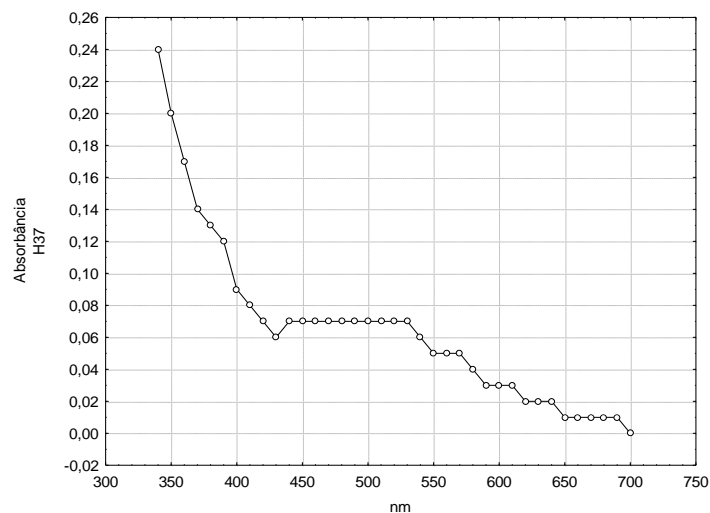


Figura 3 – Espectro do visível dos pigmentos produzidos em meio sólido pelo isolado H37

4. Conclusão

Os isolados LU6 e H37, pertencentes ao gênero *Fusarium* foram selecionados como mais adequados produtores de pigmentos. O bioprocesso em meio líquido utilizando Glicose como fonte de carbono e Glutamato como fonte de nitrogênio foi adequado para produção de pigmentos.

5. Referências

Babitha, S.; Soccol, C.R.; Pandey, A. 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. **Bioresource Technology**. 98, p. 1554–1560.

Carvalho, F. A. 2005. Efeitos da fragmentação florestal na florística e estrutura de fragmentos de Mata Atlântica submontana na região de Imbaú, município de Silva Jardim, RJ. 124f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.

Hajjaj, H.; Blanc, P.; Groussac, E.; Uribelarrea, J-L.; Goma, G.; Loubiere, P. 2000. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.27, p. 619–625.

Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C. 2001. Microbiologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8. d. São Paulo: Sarvier.

Mapari, S.A.S.; Nielsen, K.F.; Larsen, T.O.; Frisvad, J.C.; Meyer, A.S.; Thrane, U. 2005. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology*, v.16, p.231–238.

Spears, K. 1988. Developments in food colourings: the natural alternatives. *Trends in Biotechnology*, v.6, p. 283-288.